

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. T. Gudermann

**Interindividuelle Unterschiede in der Aktivität und Expression  
der Nitrosaminketon reduzierenden Enzyme  
11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 und Carbonylreduktase  
in der menschlichen Lunge**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Medizin  
(Dr. med.)

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Clemens Finckh**  
aus Schleswig

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am:  
26. Februar 2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. E. Maser

Koreferent: Prof. Dr. C. F. Vogelmeier

Meiner Mutter

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I-III
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	IV

**I. Einleitung ..... 1****I. 1. Lungenkrebs..... 1**

I. 1. 1. Epidemiologie .....	1
I. 1. 2. Ätiologie und Pathogenese.....	2
I. 1. 3. Klinische Manifestation .....	3
I. 1. 4. Histologie .....	3
I. 1. 5. Stadien, Tumorausdehnung und Beurteilung des Krankheitsausmaßes (Staging). 4	
I. 1. 6. Prognose.....	4
I. 1. 7. Therapie .....	5

**I. 2. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)  
(NNK = „nicotine-derived nitrosaminoketone“)..... 6**

I. 2. 1. Tabakrauch und NNK .....	6
I. 2. 2. Exposition und Passivrauchen.....	7
I. 2. 3. Stoffwechsel.....	7
I. 2. 3. 1. $\alpha$ -Hydroxylierung von NNK und DNA-Schädigung .....	8
I. 2. 3. 2. N-Oxidation .....	9
I. 2. 3. 3. Carbonylreduktion als Hauptabbauweg in Tier und Mensch.....	10
I. 2. 3. 4. Orte des Umsatzes .....	11

**I. 3. Carbonylgruppen reduzierende Enzyme im NNK-Stoffwechsel..... 12**

I. 3. 1. Klassifikation der Carbonylgruppen reduzierenden Enzyme.....	13
I. 3. 2. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11 $\beta$ -HSD) .....	13
I. 3. 2. 1. Lokalisation, Stabilität und Unterformen .....	13
I. 3. 2. 2. Überblick über die Funktionen .....	14
I. 3. 2. 3. Bedeutung im körpereigenen Stoffwechsel .....	14
I. 3. 2. 4. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 .....	15
I. 3. 2. 5. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2.....	15
I. 3. 2. 6. 11 $\beta$ -HSD 1, Xenobiotika und NNK.....	17
I. 3. 2. 6. 1. Umsatz von Metyrapon .....	18
I. 3. 2. 6. 2. Umsatz von NNK.....	19
I. 3. 3. Carbonylreduktase .....	19

---

I. 3. 3. 1. Überblick .....	19
I. 3. 3. 2. Genetik und Lokalisation.....	19
I. 3. 3. 3. Funktion und Substrate .....	20
<b>I. 4.    Schlußfolgerung .....</b>	<b>21</b>
<b>I. 5.    Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>II.    Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>II. 1.    Aufarbeitung von frischem Lungengewebe.....</b>	<b>23</b>
II. 1. 1. Herkunft und Transport.....	23
II. 1. 2. Vorbereitung des Gewebes für die Präparationen.....	23
II. 1. 3. Präparation der Proben für die RT-PCR .....	23
II. 1. 4. Präparation für die Bestimmung der Enzymkinetiken und den ELISA .....	24
<b>II. 2.    Ermittlung der Enzymkinetiken.....</b>	<b>28</b>
II. 2. 1. Allgemeines .....	28
II. 2. 2. Inkubation der Zellfraktionen .....	28
II. 2. 3. HPLC .....	30
II. 2. 3. 1. Überblick .....	30
II. 2. 3. 2. Meßverlauf.....	31
II. 2. 3. 3. Eichung und Auswertung.....	31
II. 2. 4. Proteinbestimmung nach Bradford .....	32
II. 2. 4. 1. Überblick .....	32
II. 2. 4. 2. Erstellung einer Eichreihe.....	33
II. 2. 4. 3. Erstellung der Probenreihe.....	33
II. 2. 4. 4. Auswertung.....	33
<b>II. 3.    RT-PCR .....</b>	<b>34</b>
II. 3. 1. Allgemeines .....	34
II. 3. 2. RNA-Isolierung.....	34
II. 3. 3. RNA-Mengen-Messung und Reinheitsbestimmung .....	35
II. 3. 4. RT-PCR von 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase .....	36
II. 3. 4. 1. Überblick .....	36
II. 3. 4. 2. Herstellung des Reaktionsansatzes .....	37
II. 3. 4. 3. Primerauswahl für reverse Transkription und PCR.....	38
II. 3. 4. 4. Anmerkungen zur Primerauswahl .....	38
II. 3. 4. 5. Reaktionen im Thermocycler.....	39
II. 3. 4. 6. Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	40

---

<b>II. 4. ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay .....</b>	<b>41</b>
II. 4. 1. Allgemeines .....	41
II. 4. 2. Reaktionsbedingungen und -abfolge auf der Mikrotiterplatte .....	41
II. 4. 2. 1. Erster Antikörper .....	41
II. 4. 2. 2. Blockung.....	42
II. 4. 2. 3. Antigen .....	43
II. 4. 2. 4. Zweiter Antikörper .....	43
II. 4. 2. 5. Dritter Antikörper .....	43
II. 4. 2. 6. Farbentwicklung und ihre Messung.....	44
II. 4. 3. Waschvorgang.....	44
<b>II. 5. Inhibitoruntersuchung .....</b>	<b>45</b>
<b>III. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>III. 1. Enzymkinetik der Carbonylreduktion von NNK.....</b>	<b>46</b>
<b>III. 2. RT-PCR der mRNA für 11<math>\beta</math>-HSD 1 und Carbonylreduktase .....</b>	<b>50</b>
<b>III. 3. ELISA: Die Expression der 11<math>\beta</math>-HSD 1 in Lungenmikrosomen .....</b>	<b>53</b>
<b>III. 4. Inhibitoruntersuchungen der carbonylreduzierenden Enzyme .....</b>	<b>54</b>
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>IV. 1. Zur Entstehung von Krebserkrankungen .....</b>	<b>57</b>
<b>IV. 2. NNK als Karzinogen.....</b>	<b>57</b>
<b>IV. 3. Bedeutung der Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
<b>IV. 4. Die individuelle Empfindlichkeit für NNK und das Lungenkrebsrisiko .....</b>	<b>60</b>
IV. 4. 1. Die Enzyme.....	61
IV. 4. 2. Die Glucuronidierung .....	62
IV. 4. 3. Die genetische Prädisposition .....	63
<b>IV. 5. Ausblick .....</b>	<b>63</b>
<b>IV. 6. Fazit.....</b>	<b>64</b>
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>VII. Anhang .....</b>	<b>79</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. I. 2.: Überblick über bedeutende Teile des NNK-Stoffwechsels .....	8
Abb. I. 3.: Die NNK-N-Oxidation als Entgiftungsweg.....	10
Abb. I. 4.: Die Carbonylreduktion von NNK zu NNAL.....	11
Abb. I. 5.: Die UDP-Glucuronyltransferase bewirkt die Bildung des NNAL-Glucuronids ....	11
Abb. I. 6.: Die NNK-Carbonylreduktion durch 11 $\beta$ -HSD 1 und CR.....	12
Abb. I. 7.: Katalyse der Oxidoreduktion von Cortisol/Cortison durch die 11 $\beta$ -HSD .....	14
Abb. I. 8.: Metyrapon als Substrat der 11 $\beta$ -HSD 1 .....	18
Abb. II. 1.: Schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISA .....	42
Abb. III. 1.: Michaelis-Menten-Kinetik der Enzyme in Mikrosomen und Cytosol (graphisch). 49	
Abb. III. 2. a): RT-PCR-Banden 11 $\beta$ -HSD 1 .....	51
Abb. III. 2. b): RT-PCR-Banden CR.....	52
Abb. III. 3.: ELISA.....	53
Abb. III. 4.: Inhibitorempfindlichkeit von 11 $\beta$ -HSD 1 und CR .....	55

**Tabellenverzeichnis**

Tab. I. 1.: Merkmale der Isoenzyme der humanen 11 $\beta$ -HSD .....	17
Tab. II. 1.: Übersicht der Patientenanamnesen .....	25
Tab. III. 1.: Michaelis-Menten-Kinetik. Werte für Mikrosomen und Cytosol.....	47
Tab. III. 3.: ELISA.....	53
Tab. III. 5.: Gesamtübersicht der Ergebnisse.....	56

## **I. Einleitung**

### **I. 1. Lungenkrebs**

Die meisten Tumoren der Lunge entwickeln sich histogenetisch aus Teilen des Bronchialsystems. Daher wird für den Lungenkrebs im Sinne von bösartigen epithelialen Neubildungen synonym auch der Begriff des Bronchialkarzinoms verwendet. Aus anderen Gewebeteilen entstehen maligne Tumoren wie z.B. Mesotheliome, Lymphome oder Sarkome.

Im folgenden soll die Krankheit zum besseren Verständnis der erhobenen Patientendaten charakterisiert werden (vgl. Tabelle II. 1.).

#### **I. 1. 1. Epidemiologie**

In den USA hat sich das Bronchialkarzinom bei beiden Geschlechtern zur zweithäufigsten Krebserkrankung entwickelt - bei Männern wird es durch das Prostatakarzinom übertroffen, bei Frauen durch den Brustkrebs. Darüber hinaus führt es mit 70 Todesfällen pro 100000 Einwohner (DE VITA, JR. et al., 1997) inzwischen geschlechtsunabhängig die Liste der Krebstodesursachen an: Das Bronchialkarzinom ist für 32% der Krebstodesfälle bei Männern und für 25% (erwartet für 2001) der Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich (GLOBOCAN 2000; GREENLEE et al., 2001). Der Häufigkeitsgipfel liegt bei 55-65 Jahren, das Erkrankungsrisiko für Frauen ist insgesamt um den Faktor 1,5 erhöht (FAUCI et al., 1998).

In Deutschland ist der Lungenkrebs bei Männern nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste, bei Frauen nach Brust- und Darmkrebs die dritthäufigste Krebserkrankung. Bei den Krebstodesursachen der Männer steht das Bronchialkarzinom an erster Stelle (26%), bei den Frauen nach Brust- und Darmkrebs an dritter Stelle (8%) (GLOBOCAN 2000).



### **I. 1. 2. Ätiologie und Pathogenese**

In 90% der Fälle bei Männern und in 79% der Fälle bei Frauen wird das Rauchen als Ursache für den Lungenkrebs angesehen (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1989).

Die Zahl der Raucher weltweit wird auf eine Milliarde geschätzt, wobei jährlich insgesamt von 1,2 Millionen Erkrankungen an Bronchialkarzinom ausgegangen wird (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

Das relative Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, ist für Raucher 13 mal, für Passivraucher 1,5 mal höher als für Nichtraucher (FAUCI et al., 1998). Dabei sind es weniger als 20% der Raucher, die Lungenkrebs bekommen (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1986). In den USA rauchen 28% der Männer und 25% der Frauen über 18 Jahren.

Mehr Frauen als Männer mit Bronchialkarzinom haben niemals geraucht (FAUCI et al., 1998). Dies spricht zusammen mit dem insgesamt erhöhten Erkrankungsrisiko (siehe oben) für eine höhere Empfindlichkeit des weiblichen Geschlechts für die schädigende Wirkung des Tabaks. Die Zusammensetzung des Tabaks wird in Kapitel I. 2. 1. dargestellt.

Ferner werden u.a. Asbest, Radon, Bis(chlormethyl)ether, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Chrom, Nickel und anorganische Arsenbestandteile für die Entstehung des Bronchialkarzinoms verantwortlich gemacht. Einige dieser Stoffe vervielfältigen durch synergistische Effekte die krebserregende Wirkung des Tabaks (DE VITA, JR. et al., 1997).

Auf molekularer Ebene wurden Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen gefunden, wie ein alkylierungsbedingter Basenaustausch im k-ras-Protoonkogen mit der Folge einer Aktivierung oder ein alkylierungsbedingter Basenaustausch im Tumorsuppressorgen p53 mit der Folge einer Inaktivierung (vgl. auch Kapitel I. 2. 3. 1.) (RODENHUIS et al., 1987; BELINSKY et al., 1989, 1990; HOLLSTEIN et al., 1991; LEHMAN et al., 1991).

### **I. 1. 3.      Klinische Manifestation**

Das verzögerte Auftreten von spezifischen sowie unspezifischen Symptomen ist mitverantwortlich für die häufig späte Diagnosestellung. Klinische Zeichen wie Husten, Atemnot, Thoraxschmerz, aber auch Ausfälle des sympathischen Nervensystems (Horner-Syndrom) sind durch die Ausbreitung und den Stoffwechsel des Tumors bedingt. Dazu gehören die lokale Größenzunahme, die Invasion und Obstruktion angrenzender Strukturen, die Infiltration regionaler Lymphknoten und der Übertritt ins Lymphgefäßsystem, das Wachstum entfernter Metastasen und die Freisetzung von Hormonen wie z.B. ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) bei dem paraneoplastischen Syndrom (FAUCI et al., 1998).

### **I. 1. 4.      Histologie**

Nach histologischen Merkmalen werden zwei große Gruppen von Bronchialkarzinomen unterschieden:

#### **I.)      Kleinzelliges Bronchialkarzinom**

(SCLC = „small cell lung cancer“, auch „oat-cell-carcinoma“ – (oat = Hafer – nach der Zellform)):

18% der Fälle; überwiegend zentral gelegen; schlechte Prognose, da frühzeitige Metastasierung und schnelles Wachstum; eventuell Produktion von Hormonen (paraneoplastische Endokrinopathien).

#### **II.)      Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom**

(NSCLC = „non small cell lung cancer“):

73% der Fälle; mit den Untergruppen:

- **Plattenepithelkarzinom** (auch „epidermoid carcinoma“): 29% der Fälle; überwiegend zentral, endobronchial gelegen; raumfordernd.
- **Adenokarzinom** (einschließlich Alveolarzellkarzinom): 35% der Fälle; periphere Lokalisation, eventuell Mitbeteiligung der Pleura; häufigste Lungenkrebsform bei Nichtrauchern; Sonderform: bronchioloalveoläres Adenokarzinom (auch Alveolarzellkarzinom), häufig mit diffus verteilten Einzelherden.
- **Großzelliges Bronchialkarzinom**: 9% der Fälle; periphere Lage.

Die Prozentangaben in der Literatur sind unterschiedlich (hier: FAUCI et al., 1998), da ein Tumor häufig mehrere histologische Anteile enthält. Die fehlenden Anteile sind seltene Tumoren z.B. des Bindegewebes, Karzinoide, Bronchialdrüsenkarzinome (wie adenoidzystische oder mukoepidermoide Tumoren) oder auch nicht spezifizierte Karzinome.

#### **I. 1. 5. Stadien, Tumorausdehnung und Beurteilung des Krankheitsausmaßes (Staging)**

Für ein Tumor-Staging beim NSCLC erfolgt eine Stadieneinteilung in die Stufen I-IV nach der TNM-Klassifikation, in der Größe und Ausbreitung des Primärtumors berücksichtigt werden (T) und in der das Ausmaß des Befalls regionaler Lymphknoten (N) und die Bildung von Fernmetastasen (M) beschrieben werden.

Für den SCLC ist eine vereinfachte Einteilung in ein begrenztes („limited-stage disease“, in 30% der Fälle) und ein ausgedehntes Stadium („extensive-stage disease“, in 70% der Fälle) verbreitet, bei der im wesentlichen die Ausdehnung über regionale Lymphknotengebiete hinaus entscheidend ist.

Ferner werden vier Differenzierungsgrade unterschieden: G 1 (gut differenziert – gute Prognose) bis G 4 (undifferenziert), „differenziert“ bedeutet eine hohe Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe. Dieses sogenannte „Grading“ wird ferner von Kern- und Mitosezahl-atypien bestimmt.

Neben dem frühen regionalen Lymphknotenbefall bilden sich hämatogene Fernmetastasen mit häufigem Auftreten in Leber, Skelett, Nebennieren und Gehirn; extrathorakale Metastasen finden sich (im Autopsiematerial) bei 50% der Plattenepithelkarzinome, 80% der Adenokarzinome und Großzelligen Bronchialkarzinome sowie bei über 95% der Kleinzelligen Bronchialkarzinome (FAUCI et al., 1998).

#### **I. 1. 6. Prognose**

Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist insgesamt schlecht. 86% der Patienten mit der Diagnose „primäres Karzinom der Lunge“ sterben innerhalb von 5 Jahren nach Diagno-

sestellung. Zu diesem Zeitpunkt liegen in über 55% der Fälle Fernmetastasen vor. Bei nur 15% findet man lediglich einen lokalen Tumor, bei 25% einen Befall regionaler Lymphknoten mit jeweils besserer Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich von den 1960er Jahren bis in die 1990er Jahre nur von 8% auf 14% verbessert (FAUCI et al., 1998), wobei zu berücksichtigen ist, daß sich die Überlebensraten für die Patienten je nach Tumorart unterscheiden: Sie variieren, unter Einbeziehung aller Stadien, von 5% beim kleinzelligen Karzinom über 17% beim Adenokarzinom bis zu 83% beim Karzinoid, einem seltenen hormonbildenden Malignom.

### **I. 1. 7. Therapie**

Die Therapie richtet sich nach dem Ergebnis der Staging-Untersuchungen, insbesondere auch nach der histologischen Klassifizierung. So spricht der SCLC, überwiegend in palliativer (lebensverlängernder bzw. lebensqualitätsverbessernder) Absicht, meist besser auf eine Chemotherapie (eventuell Radiochemotherapie) als auf eine Strahlentherapie an. Letztere gilt in Verbindung mit einer Operation und eventuell einer Chemotherapie als besonders geeignet für den NSCLC, der häufiger als der SCLC kurativ (mit Aussicht auf vollständige Heilung) behandelt werden kann. In den Therapieprotokollen ist eine Reihe von Variationen und Kombinationen möglich, zu denen nicht zuletzt adjuvante (postoperative) und neoadjuvante (präoperative, bei zunächst inoperablen Tumoren in niedrigeren Stadien – das sogenannte „downstaging“) Therapieansätze gehören (FAUCI et al., 1998).

## I. 2. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)

(NNK = „nicotine-derived nitrosaminoketone“)

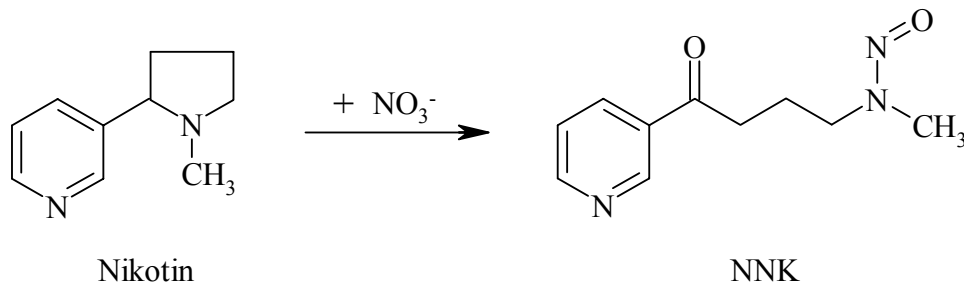


Abb. I. 1.: Entstehung von NNK. Tabak enthält Nikotin, das bei seiner Verarbeitung zum Teil zu NNK umgewandelt wird.

### I. 2. 1. Tabakrauch und NNK

Tabakrauch ist ein Gemisch aus über 4000 Substanzen (ROBERTS, 1988), von denen im Tierversuch mindestens 40 kanzerogenes Potential im Sinne von Kanzerogenen, Tumorinitiatoren oder Promotoren besitzen (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1986). Letzteren gehören als quantitativ und qualitativ stärkste Kanzerogene die tabakspezifischen Nitrosamine an (HECHT & HOFFMANN, 1988), zu denen insbesondere auch 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) zählt (FISCHER et al., 1990; HOFFMANN et al., 1999). Sie entstehen durch Nitrosierung von Nikotin als tertiäres Amin während der Tabakreifung und -lufttrocknung (vgl. Abbildung I. 1.) (BURTON et al., 1989). Im Tiermodell - und teilweise auch beim Menschen - nachgewiesenen kanzerogen wirksame Inhaltsstoffe sind u.a. Benzo(a)-pyrene, Dibenz(a)-antrazen, Nikotin, Catechol, Nickel, Cadmium, <sup>210</sup>Polonium und Hydrazine (DE VITA, JR. et al., 1997).

Im tierischen Organismus zeigt NNK eine offensichtliche Tendenz, die Lunge zu schädigen; so entstanden unabhängig von der Art der Applikation (äußerlich, oral, intraperitoneal, subkutan oder intravenös) vorwiegend Adenokarzinome in den Lungen von Ratten, Mäusen und Hamstern (CASTONGUAY et al., 1983; HOFFMANN & HECHT, 1985; HECHT & HOFFMANN, 1988; RIVENSON et al., 1988). Daneben wurden bei Ratten auch Nasenschleimhaut-, Pankreas- und Leber-Tumoren gefunden (HOFFMANN & HECHT, 1985; HECHT, 1994).

Eine Reihe menschlicher Krebsformen läßt sich vermutlich auf die tabakspezifischen Nitrosamine zurückführen (HOFFMANN & HECHT, 1985; PRESTON-MARTIN, 1991; HECHT, 1994). Gerade NNK wird für die Genese von tabakrauch-assoziiertem Lungenkrebs bei Rauchern mitverantwortlich gemacht, da u.a. in Raucherlungen DNA-Addukte gefunden wurden, die offensichtlich dem NNK-Metabolismus (siehe unten) zuzuordnen sind (HECHT & HOFFMANN, 1989; FOILES et al., 1991; MUSTONEN et al., 1993).

### **I. 2. 2.      Exposition und Passivrauchen**

Die in einer Zigarette vorhandene Menge an NNK kann 1-100 µg betragen (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1985; TRICKER et al., 1991). Dabei ist bemerkenswert, daß im Nebenstrom des Rauchs, der zwischen den Zügen am glimmenden Ende der Zigarette entsteht, häufig mehr NNK gemessen wird als im Hauptstrom, so daß eine potentielle Gefahr für Passivraucher naheliegt (HECHT & HOFFMANN, 1988) - zumal die Partikelgröße im Nebenstrom geringer ist, wodurch ein leichteres Eindringen in das Bronchialsystem möglich wird (HOFFMANN et al., 1983). Diese Überlegung wird dadurch gestützt, daß bei Nichtrauchern, die dem Nebenstromrauch ausgesetzt wurden, NNK-Metabolite im Urin zu finden waren (HECHT et al. (a), 1993).

### **I. 2. 3.      Stoffwechsel**

Neben dem Ausmaß der Exposition ist für die Kanzerogenität von Substanzen wie NNK von erheblicher Bedeutung, inwieweit der individuelle Organismus in der Lage ist, den Fremdstoff über verschiedene Stoffwechselwege zu aktivieren, mit der Folge einer DNA-Alkylierung, oder zu inaktivieren, mit anschließender Ausscheidung.

Im folgenden sind entscheidende Stoffwechselwege von NNK aufgezeichnet (vgl. Abbildung I. 2.).

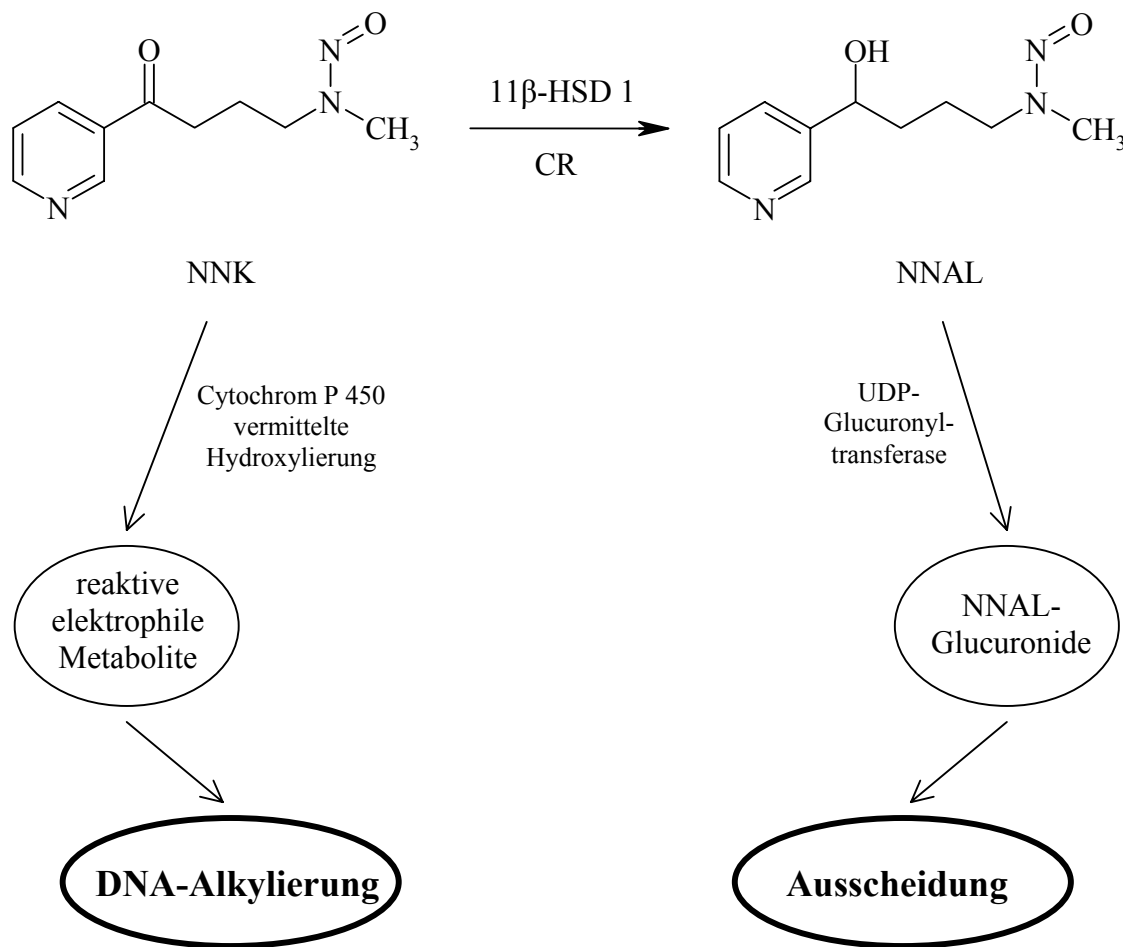


Abb. I. 2.: Überblick über bedeutende Teile des NNK-Stoffwechsels. Die N-Oxidation ist hier nicht berücksichtigt. 11β-HSD 1, CR: vgl. Kapitel I. 3.; NNAL: vgl. Kapitel I. 2. 3. 3..

### I. 2. 3. 1. α-Hydroxylierung von NNK und DNA-Schädigung

Seine kanzerogene Wirkung erlangt NNK erst nach einer Cytochrom P 450-vermittelten α-Hydroxylierung (CRESPI et al., 1991) der α-Methylen- oder Methylcarbongruppe, die zur Bildung von reaktiven elektrophilen Metaboliten führt. Letztere können auf der Stufe der Diazohydroxide mit Hämoglobin oder DNA in Form einer Alkylierung (Methylierung oder Pyridyloxobutylierung) in Verbindung treten und so die hohe Kanzerogenität von NNK bedingen (vgl. Abbildung I. 2.) (HOFFMANN & HECHT, 1985; HECHT, 1994). Im k-ras-Gen (siehe unten) entsteht beispielsweise O-6-Methylguanin (O6MG) (BELINSKY et al., 1990).

Neben der genannten Cytochrom P 450-Steuerung scheinen gerade in menschlichen Lungenmikrosomen weitere Enzymsysteme wie Lipoxxygenasen und andere Peroxidasen erheblich zur Aktivierung von NNK beizutragen (SMITH et al., 1995).

Die Wirkung von NNK auf die DNA, insbesondere bezogen auf das Tumorsuppressorgen p53 (Inaktivierung) und das Protoonkogen k-ras (Aktivierung), die beide in Bronchialkarzinomen verändert gefunden wurden, wird vielfältig beschrieben: Bei Lungentumoren von Ratten fanden sich k-ras Mutationen, die jedoch nicht von NNK verursacht wurden, p53 scheint in der Genese der Lungenkarzinome hier keine große Rolle zu spielen (BELINSKY et al., 1997); ein in Mäusen mutiertes p53-Gen erwies sich als empfindlich gegen NNK (LUBET et al., 2000); Versuche an Hamstern ergaben NNK-induzierte k-ras-Mutationen mit Aktivierung, jedoch keine vergleichbaren Veränderungen von p53 (OREFFO et al., 1993); das Fehlen eines p53-Allels ändert nicht die Quantität oder Qualität von NNK-induzierten Tumoren in Mäusen, das p53-Gen scheint zudem nicht in großem Maße in die Entwicklung von Adenomen in Mäuselungen einbezogen zu sein (MATZINGER et al., 1995); nicht zuletzt wurden Unterschiede zwischen Ratten entdeckt, deren NNK-induzierte Lungentumoren keine k-ras-Mutationen zeigten, und Mäusen, die sehr wohl NNK-assoziierte k-ras-Mutationen im Sinne einer Aktivierung aufwiesen (BELINSKY et al., 1990). Auch in menschlichen Lungentumoren sind derartige Veränderungen zu finden, die für die Entwicklung von malignem Gewebe mitverantwortlich gemacht werden, allerdings bestehen diesbezüglich kaum Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern, so daß ein Einfluß von NNK auf p53 und k-ras fraglich ist, andere kanzerogene Faktoren dürften hier eine Rolle spielen (GAO, 1997). Insgesamt sind also DNA-Schäden durch NNK an der Genese von Bronchialkarzinomen des Menschen wahrscheinlich, jedoch an anderen Regulationsgenen als k-ras oder p53. Diese können natürlich von anderen Noxen beeinflusst werden.

### **I. 2. 3. 2. N-Oxidation**

Ein weiteres Stoffwechselprodukt ergibt sich aus der Pyridin-N-Oxidation: das NNK-N-Oxid (vgl. Abbildung I. 3.). Es erwies sich als signifikant weniger kanzerogen als NNK und damit als Entgiftungsprodukt (HECHT, 1994). Die geringen Mengen an NNK-N-Oxiden im Urin von Rauchern und nichtrauchenden Tabakkonsumenten (Schnupf- oder



Kautabak) zeigten jedoch die untergeordnete Rolle, die dieser Prozeß im menschlichen Organismus einnehmen dürfte (CARMELLA et al., 1997).

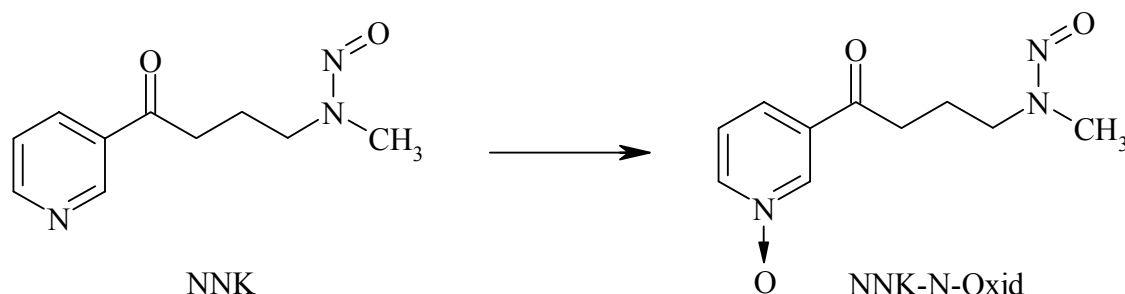


Abb. I. 3.: Die NNK-N-Oxidation als Entgiftungsweg.

### I. 2. 3. 3. Carbonylreduktion als Hauptabbauweg in Tier und Mensch

Die Carbonylreduktion von NNK zu 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL = „nicotine-derived nitrosaminoalcohol“) gilt als Hauptabbauweg (vgl. Abbildung I. 4.), wie in vitro-Versuche an Tieren und menschlichen Geweben zeigten (ROSSIGNOL et al., 1989; LIU et al., 1990; MORSE et al., 1990; MURPHY et al., 1990; GUO et al., 1992; DEMKOWICZ-DOBRZANSKI & CASTONGUAY, 1992; JORQUERA et al., 1992; SCHULZE et al., 1995).

An Labortieren konnte in vivo mittels Metaboliten-Messung in Blut (Hamster, Ratte, Maus, Pavian) und Urin (Husarenaffe) nach i.v.-Gabe von NNK nachgewiesen werden, daß die Carbonylreduktion zu NNAL der  $\alpha$ -Hydroxylierung in ihrer Bedeutung mindestens ebenbürtig ist (ADAMS et al. (a), 1985; ADAMS et al. (b), 1985; HECHT et al. (b), 1993). Schließlich erfolgten Untersuchungen am lebenden Menschen, bei denen Metabolite des NNK im Urin von Rauchern und nichtrauchenden Tabakkonsumenten (Kau- oder Schnupftabak) bestimmt wurden; auch dabei erwies sich die Carbonylreduktion mit nachfolgender Glucuronidierung (HECHT, 1996; siehe unten, vgl. Abbildung I. 5.) als deutlich bevorzugter Entgiftungsmechanismus für NNK (CARMELLA et al., 1993, 1995, 1997; MURPHY et al., 1994; KRESTY et al., 1996).

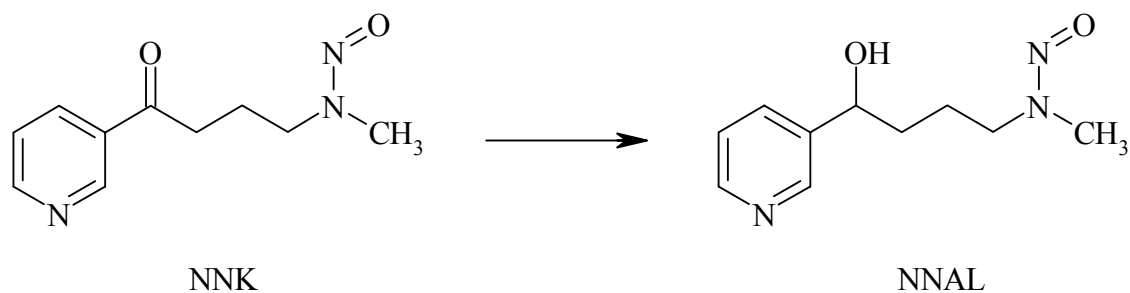


Abb. I. 4.: Die Carbonylreduktion von NNK zu NNAL.

Die Möglichkeit der Glucuronidierung von NNAL, also der Konjugation mit Glucuronsäure durch die UDP-Glucuronyltransferase, macht die besondere Rolle der NNK-Reduktion als entscheidenden Schritt zur Entgiftung deutlich, da glucuronidiertes NNAL über die Galle oder den Urin ausgeschieden werden kann (vgl. Abbildung I. 2.) (SCHULZE et al., 1992; HECHT et al., 1993 (a + b)). Dennoch gilt NNAL wie NNK als kanzerogen.

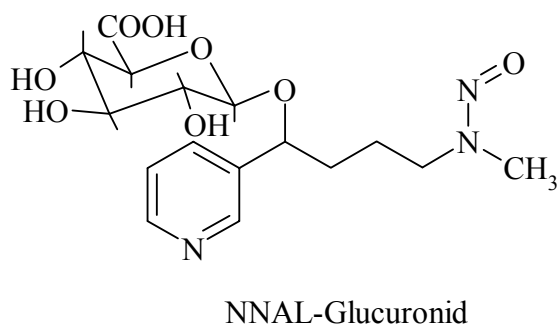


Abb. I. 5.: Die UDP-Glucuronyltransferase bewirkt die Bildung des NNAL-Glucuronids.

#### I. 2. 3. 4. Orte des Umsatzes

In vitro-Untersuchungen an isolierten Zellen und Mikrosomenpräparationen verschiedener tierischer Organe ergaben organspezifische Unterschiede in der Verstoffwechselung von NNK. So wurde NNAL als Hauptmetabolit in Leberzellen (LIU et al., 1990) und Lebermikrosomen (MORSE et al., 1990; GUO et al., 1992; SMITH et al., 1993) von Ratten bzw. Mäusen gefunden. In Lungenmikrosomen von Ratten und Mäusen (SMITH et al., 1990; GUO et al., 1992; SMITH et al., 1992) und in kultivierten

Lungenzellen vom Hamster lag die Carbonylreduktion in vergleichbarer Höhe mit der  $\alpha$ -Hydroxylierung und N-Oxidation. In den Zellen und Mikrosomen der Nasenschleimhaut von Ratten konnte NNAL als Stoffwechselprodukt nicht nachgewiesen werden (BRITTEBO et al., 1983; HONG et al., 1991; GUO et al., 1992; SMITH et al., 1992). Damit ließe sich die im Tierversuch gezeigte höhere Empfindlichkeit der Nasenschleimhaut auf NNK als Karzinogen erklären.

### I. 3. Carbonylgruppen reduzierende Enzyme im NNK-Stoffwechsel

Um die beschriebenen Erkenntnisse zu vervollständigen, war und ist die Identifizierung von Enzymen erforderlich, die die Carbonylgruppe des NNK reduzieren. Erstmals konnte 1996 in der Mäuseleber die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11  $\beta$ -HSD 1) als Reduktase für NNK identifiziert werden (MASER et al., 1996). Darüber hinaus wurde in menschlicher Lunge und Leber eine Reihe NNK reduzierender Enzyme gefunden (ATALLA et al., 1999, 2000; MASER et al., 2000), von denen offensichtlich die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 und die cytosolische Carbonylreduktase (CR) die bedeutendste Rolle für die NNK-Entgiftung spielen (vgl. Abbildungen I. 2. und I. 6.) (MASER et al., 2000).

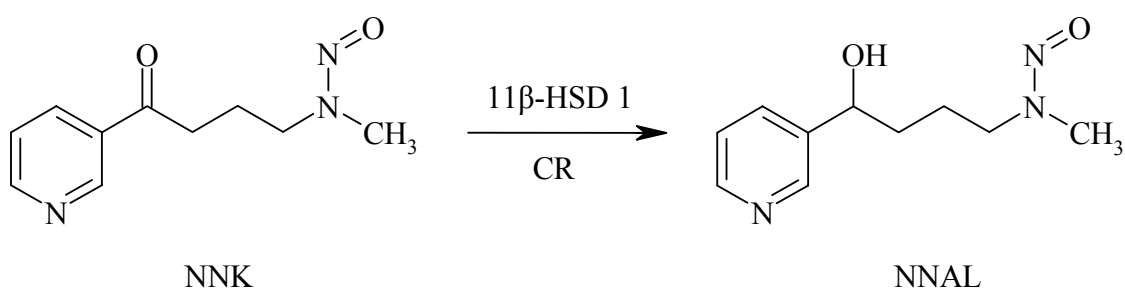


Abb. I. 6.: Die NNK-Carbonylreduktion durch 11 $\beta$ -HSD 1 und CR.

### **I. 3. 1. Klassifikation der Carbonylgruppen reduzierenden Enzyme**

Carbonylgruppen reduzierende Enzyme werden in zwei große Proteinsuperfamilien eingeteilt: die Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) und die kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR = short-chain dehydrogenases/reductases). Zu den AKR gehören u.a. die Aldehydreduktase, die Aldosereduktase und die Dihydrodioldehydrogenase. Sowohl die 11 $\beta$ -HSD 1 als auch die cytosolische Carbonylreduktase gehören der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen an. Im internationalen Enzym-Nomenklatursystem (EC) ist die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 als EC 1. 1. 1. 146, die cytosolische Carbonylreduktase als EC 1. 1. 1. 184 bezeichnet (MASER (b), 1998).

### **I. 3. 2. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11 $\beta$ -HSD)**

#### **I. 3. 2. 1. Lokalisation, Stabilität und Unterformen**

11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen kommen sowohl im tierischen als auch im menschlichen Organismus in diversen Organen als intrazellulär gelegene, membranständige Enzyme vor, die beispielsweise in der Leber in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums ragen (OZOLS, 1995) und somit nach dem experimentellen Zellaufschluß in der sogenannten Mikrosomenfraktion vorliegen.

In ihrer dreidimensionalen Struktur sind sie instabil, so daß die Isolierung in der aktiven Form bisher nur teilweise gelungen ist (siehe unten), zudem stellt sich die Reinigung der lungenständigen Isoform bisher als problematisch dar (MASER (a), 1998). Die Reinigung der aktiven 11 $\beta$ -HSD 1 aus menschlicher Leber konnte dagegen inzwischen durchgeführt werden (MASER et al., 2002).

Man unterscheidet heute nach genetischen Gesichtspunkten, Lokalisation, Kinetik und Funktion zwei Isoformen der 11 $\beta$ -HSD: 11 $\beta$ -HSD 1 und 2, eine dritte Form wird vermutet.

### I. 3. 2. 2. Überblick über die Funktionen

Die Funktion der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen ist im wesentlichen die Umwandlung von 11-Hydroxy- zu 11-Ketoglukokortikoiden und umgekehrt: Im menschlichen Organismus wird Cortisol zu Cortison (vgl. Abbildung I. 7.), im tierischen Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron umgesetzt und umgekehrt (MONDER & SHACKLETON, 1984; MASER (b), 1998). Darüber hinaus werden auch Nicht-Steroide verstoffwechselt (MASER & BANNENBERG (a), 1994). So spielen die 11 $\beta$ -HSD zum einen eine Rolle im physiologischen Steroidmetabolismus des menschlichen Körpers und dienen zum anderen, im Falle der Isoform 1, der Transformation von Fremdstoffen (Xenobiotica).

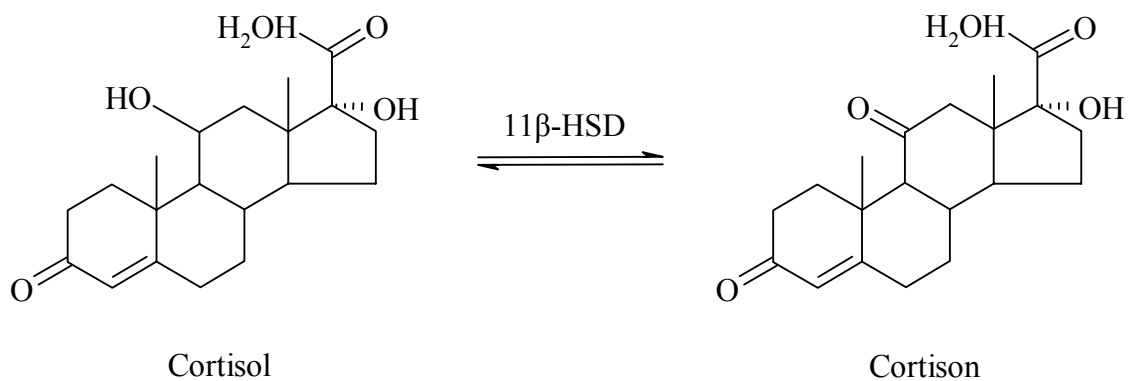


Abb. I. 7.: Katalyse der Oxidoreduktion von Cortisol/Cortison durch die 11 $\beta$ -HSD.

### I. 3. 2. 3. Bedeutung im körpereigenen Stoffwechsel

Die Bedeutung im Steroidstoffwechsel begründet sich vorwiegend darin, daß die 11 $\beta$ -HSD gewebsspezifische Aktivitäten aufweisen (FREY et al., 1994). Da Cortison (11-Ketosteroid) im Gegensatz zum aktiven Cortisol (11-Hydroxysteroid) nicht in der Lage ist, an Glukokortikoid- oder Mineralokortikoidrezeptoren zu binden (BALLARD et al., 1975; FUNDER, 1989), kann so je nach Organ und vorhandener Enzymkapazität das Cortisol-Cortison-Gleichgewicht und damit die Wirkung des Cortisols durch die 11 $\beta$ -HSD reguliert werden. Es handelt sich dabei also um eine Prä-Rezeptor-Regulation, die die Spezifität von Steroidhormonen beeinflusst.

#### **I. 3. 2. 4. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1**

Das menschliche Gen für die 11 $\beta$ -HSD 1 ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert, besteht aus sechs Exons und hat eine Größe von 9 kb (MASER (b), 1998). Die enzymatische Aktivität zeichnet sich durch niedrige Substrat-Affinität und  $K_m$ -Werte im  $\mu$ mol-Bereich aus. Die Funktion als Dehydrogenase und Reduktase ist NADP<sup>+</sup>- bzw. NADPH- abhängig, wie sich in Homogenaten oder gereinigten Mäuseleber-Enzymen gezeigt hat (MASER & BANNENBERG (a), 1994; MASER & BANNENBERG (b), 1994). Die Möglichkeiten des Umsatzes von Nicht-Steroiden werden in Kapitel I. 3. 3. 6. dargestellt .

Eine hohe Enzymexpression liegt insbesondere in der Leber vor (WHORWOOD et al., 1992), aber auch in den Gonaden, der Hypophyse, dem Kleinhirn und der Lunge.

In vitro zeigte gereinigte 11 $\beta$ -HSD 1 aus der Mäuseleber sowohl reduzierende als auch oxidierende Eigenschaften (MASER & BANNENBERG (a), 1994). Allerdings war unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich die Reduktion nachzuweisen – z.B. die Bildung von Cortison zu Cortisol (JAMIESON et al., 1995; VOICE et al., 1996). Dadurch wird eine Erhöhung der intrazellulären Cortisol-Konzentration und somit eine organspezifische Steigerung der Wirkung von Glukokortikoiden erreicht. Den Nutzen dieser Funktion nimmt man beispielsweise für Zellen an, die trotz tageszeitlicher Schwankungen der Plasma-Cortisol-Werte einen konstanten bzw. erhöhten Bedarf an Cortisol haben (SECKL & CHAPMAN, 1997). Damit erklärt sich auch eine entscheidende pharmakokinetische Eigenschaft: Bei oraler Gabe von Cortison oder Prednison ist eine Umwandlung in Cortisol bzw. Prednisolon erforderlich, um eine systemische Wirkung zu erreichen (FREY et al., 1994).

Die in vitro - in vivo - Unterschiede lassen eine erhebliche Bedeutung von Einflüssen auf das Enzym auf zellphysiologischer und genetischer Ebene vermuten.

Diese und weitere Eigenschaften sind in Tabelle I. 1. zusammengefaßt.

#### **I. 3. 2. 5. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2**

Bei einer Größe von 6,2 kb sind im menschlichen Gen für die 11 $\beta$ -HSD 2 auf dem Chromosom 16 fünf Exons enthalten (MASER (b), 1998). Die Enzymkinetik zeichnet sich durch eine hohe Substrat-Affinität und  $K_m$ -Werte im nmol-Bereich aus. Auf

physiologische Glukokortikoide wirkt die 11 $\beta$ -HSD 2 allein als NAD-abhängige Dehydrogenase (STEWART et al., 1994), eine Reduktase-Aktivität wurde bisher nur für die synthetischen Glukokortikoide 11-Dehydrodexamethason und 9 $\alpha$ -Fluorcortison ermittelt (DIEDERICH et al., 1997; LI et al., 1997). Die Reinigung des Enzyms in funktionsfähiger Form ist bisher nicht gelungen, so daß auch eine eventuelle Carbonylreduktion von Nicht-Steroiden nur erschwert beurteilbar ist (MASER (b), 1998). Die Expression der 11 $\beta$ -HSD 2 findet sich in Zellen, die durch Mineralokortikoide reguliert werden (Niere, Colon, Speicheldrüsen) und in der Plazenta (WHORWOOD et al., 1995).

Endogene Glukokortikoide werden durch diese Steroiddehydrogenase in ihre Keto-Form oxidiert, d.h. inaktiviert (ALBISTON et al., 1994; STEWART et al., 1994). So wird eine Aldosteron-Selektivität - Aldosteron selbst wird von der 11 $\beta$ -HSD 2 nicht umgesetzt - der Mineralokortikoidrezeptoren gewährleistet (EDWARDS et al., 1988; FUNDER et al., 1988), an die sonst auch die aktiven Hydroxy-Formen der Glukokortikoide mit gleicher Affinität wie Aldosteron binden können (ARRIZA et al., 1987). Daraus lassen sich die pathophysiologischen Folgen einer verminderten Aktivität der 11 $\beta$ -HSD 2 aufgrund eines Mangels oder einer Hemmung ableiten. Wird Cortisol nicht umgesetzt, verursacht es wie ein Mineralokortikoid durch eine erhöhte Natrium-Retention in der Niere einen Bluthochdruck und führt zu einem gesteigerten Cortisol/Cortison-Quotienten im Urin, sowie zu supprimiertem Renin und Hypokaliämie. Dies ist beispielsweise der Fall beim „Apparent-Mineralocorticoid-Excess (AME)-Syndrom“, bei dem eine autosomal-rezessiv vererbte Veränderung des 11 $\beta$ -HSD 2-Gens die Funktion des Enzyms einschränkt und einen Hypertonus durch scheinbar vorhandenen Mineralokortikoid-Überschuß bedingt (STEWART et al., 1996). Ein weiteres Beispiel ist der übermäßige Genuß von Lakritz: Ein täglicher Verzehr von 200 g entspricht einer Aufnahme von 500 - 600 mg der in Lakritz enthaltenen Glycyrrhetinsäure, die in dieser Konzentration die 11 $\beta$ -HSD 2 mit der Folge AME-typischer Symptome hemmt (STEWART et al., 1987; WHORWOOD et al., 1993; DIEDERICH et al., 1999).

In der Plazenta hat die 11 $\beta$ -HSD 2 die Aufgabe, den Feten vor schwangerschaftsbedingt erhöhten mütterlichen Glukokortikoidkonzentrationen zu schützen (BENEDIKTSON et al., 1997).

Weitere Eigenschaften sind der Tabelle I. 1. zu entnehmen.

Tab. I. 1.: Merkmale der Isoenzyme der humanen 11 $\beta$ -HSD (DIEDERICH et al., 1999).

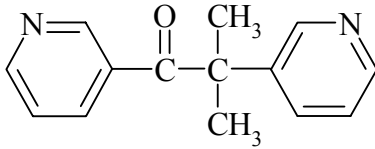
	<b>11<math>\beta</math>-HSD 1</b>	<b>11<math>\beta</math>-HSD 2</b>
<b>Enzymkinetik</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in vitro bidirektional, in vivo vor allem Reduktase</li> <li>- niedrige Substrataffinität (<math>K_m</math> im <math>\mu</math>mol-Bereich)</li> <li>- NADP/H-Präferenz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- für endogene Steroide nur Dehydrogenase-Aktivität</li> <li>- hohe Substrataffinität (<math>K_m</math> im nmol-Bereich)</li> <li>- NAD-Präferenz</li> </ul>
<b>Hohe Expression in</b>	- Leber, Lunge, Gonaden, Hypophyse, Kleinhirn	- Niere, Colon, Speicheldrüsen, Plazenta
<b>Molekularbiologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromosom 1</li> <li>- Gen: 9 kb Länge, 6 Exons</li> <li>- Enzym: 292 Aminosäuren 34 kDa Gewicht</li> <li>- 14% Homologie mit 11<math>\beta</math>-HSD 2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chromosom 16</li> <li>- Gen: 6,2 kb Länge, 5 Exons</li> <li>- Enzym: 405 Aminosäuren 40 kDa Gewicht</li> </ul>
<b>Funktion in vivo</b>	- Erhöhung der intrazellulären Cortisol-Konzentration, organspezifische Verstärkung der Glukokortikoid-Wirkung	- Spezifität des Mineralocorticoid-Rezeptors für Aldosteron gegenüber Cortisol

### I. 3. 2. 6. 11 $\beta$ -HSD 1, Xenobiotika und NNK

Der Umsatz von körperfremden, nicht-steroidalen Substanzen durch die 11 $\beta$ -HSD 1 soll anhand der folgenden Beispiele erläutert werden.



### I. 3. 2. 6. 1. Umsatz von Metyrapon



Metyrapon

Abb. I. 8.: Metyrapon als Substrat der 11 $\beta$ -HSD 1.

Metyrapon (2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon) ist ein Cytochrom P 450-abhängiger Inhibitor des 11 $\beta$ -hydroxylierenden Systems für Glucocorticoide und Mineralocorticoide in der Nebennierenrinde der Säuger (Abb. I. 8.). Klinisch-therapeutisch wurde es als Diuretikum bei schweren Ödemen, zur Behandlung des Cushing-Syndroms und diagnostisch zur Beurteilung der ACTH-Sekretion des Hypophysenvorderlappens eingesetzt (MASER & NETTER, 1991). Hinzukommend gelten metyrapon-analoge Substanzen als wirkungsvolle Insektizide (BELAI et al., 1995; REKKA et al., 1996).

Neben der Wechselwirkung mit Cytochrom P 450 unterliegt Metyrapon als Keton insbesondere der Reduktion zu Metyrapol. Neben der cytosolischen Carbonylreduktase konnte erst in den 1990er Jahren die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 gereinigt und als Reduktase von Metyrapon ermittelt werden (MASER & NETTER, 1989; MASER & BANNENBERG (b), 1994; OPPERMAN et al., 1995). Damit wurde erstmalig der Umsatz von Nicht-Steroiden mit einer Carbonylgruppe durch die 11 $\beta$ -HSD 1 der Leber nachgewiesen. Glukokortikoide und carbonylgruppenhaltige Xenobiotika binden an das gleiche katalytische Zentrum (MASER & BANNENBERG (b), 1994). Die Fremdstoffe werden weniger lipophil, löslicher, leichter konjugierbar und damit besser ausscheidbar. Die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 hat aufgrund ihrer Membranständigkeit offenbar eine bedeutendere Funktion im Xenobiotika-Stoffwechsel als die cytosolischen Carbonylreduktasen, da die meisten Carbonyl-Xenobiotika fettlöslich sind und sich in die lipidhaltigen Membranen einlagern (MASER (b), 1998).

### **I. 3. 2. 6. 2. Umsatz von NNK**

1996 wurde die 11 $\beta$ -HSD 1 als Reduktase für NNK identifiziert (MASER et al., 1996). Die Bedeutung dieses Stoffwechselweges und die Folgen einer Funktionseinschränkung der 11 $\beta$ -HSD 1 sind dem Kapitel I. 2. zu entnehmen (siehe auch Abb. I. 2.).

### **I. 3. 3. Carbonylreduktase**

#### **I. 3. 3. 1. Überblick**

Verschiedene Formen der Carbonylreduktase (CR, EC 1. 1. 1. 184) kommen in zahlreichen Organismen vor - in Säugetieren wie auch in Insekten, Pflanzen, Hefen und Bakterien. Sie reduzieren die Carbonylgruppen unterschiedlichster endogener und exogener Substanzen.

Auch die menschliche Carbonylreduktase liegt in mehreren Modifikationen bezüglich der Ladung und der Struktur des Proteins vor (WERMUTH, 1981). Zudem gibt es einen Polymorphismus des humanen Carbonylreduktase-Gens, der auf einen Basenaustausch zurückzuführen ist, dessen Auswirkung bisher jedoch nicht geklärt ist (AVRAMOPOULUS et al., 1992; FORREST & GONZALEZ, 2000).

#### **I. 3. 3. 2. Genetik und Lokalisation**

Das menschliche Gen für die Carbonylreduktase befindet sich auf dem Chromosom 21 (FORREST et al., 1990). Es besteht aus 3,1 kb und enthält drei Exons.

Die humane monomere Carbonylreduktase liegt in den meisten menschlichen Organen vor, jedoch in unterschiedlichen Mengen. Bei einer immunhistochemischen Untersuchung fanden sich beispielsweise hohe Konzentrationen im Leberparenchym, in Teilen des Zentralen Nervensystems, im Herzmuskel und im Gefäßendothel, niedrigere Konzentrationen dagegen z.B. im Kleinhirn, im Epithel der Mundhöhle und des Ösophagus, in der Schilddrüse und im Pankreas (WIRTH & WERMUTH, 1992).

In den Zellen dieser Organe ist die Carbonylreduktase überwiegend im Cytosol lokalisiert. Sie wurde darüber hinaus an Tieren auch in anderen Organellen, wie den Mitochondrien, gefunden (NAKAYAMA et al., 1988; MATSUURA et al., 1992).

### **I. 3. 3. 3. Funktion und Substrate**

Die Carbonylreduktase ist eine Oxidoreduktase aus der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (WERMUTH et al., 1988; WERMUTH, 1992), die überwiegend als NADPH-abhängige Reduktase aktiv ist.

Eine große Vielfalt an Substraten wird von der Carbonylreduktase umgesetzt. Dabei werden chemisch reaktive Carbonylgruppen inaktiviert bzw. entgiftet. Hierbei handelt es sich insbesondere um aromatische Ketone und Chinone polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe, die offensichtlich bevorzugt in der Leber metabolisiert werden (WERMUTH et al., 1986). Zudem ließ sich eine Beteiligung der Carbonylreduktase am körpereigenen Stoffwechsel der Prostaglandine und Steroide nachweisen (WERMUTH, 1981; INAZU et al., 1992).

In menschlichem Lebergewebe wurden Carbonylreduktasen isoliert, die z.B. Fremdstoffen wie Metirapon oder die Chemotherapeutika Daunorubicin und Doxorubicin (Anthrazykline) verstoffwechseln (AHMED et al., 1978; AHMED et al., 1979). Zusätzlich weist eine Reihe verschiedener Organismen wie Ratten oder Schweine Carbonylreduktasen für verschiedenste Xenobiotika und körpereigene Steroide auf (FORREST & GONZALEZ, 2000).

Im Stoffwechsel von karzinogenen Substanzen scheint die Carbonylreduktase ebenfalls von Bedeutung zu sein. Sie reduziert das tabakrauchassoziierte Karzinogen NNK zu NNAL, ähnlich der 11 $\beta$ -HSD 1 (ATALLA et al., 1999, 2000).

Zudem beeinträchtigt die Carbonylreduktase die Tumoresistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Daunorubicin und Doxorubicin. Dabei wird, wie bereits angedeutet, die Ketogruppe dieser Anthrazykline reduziert bzw. hydroxyliert. In diesem Zustand gelten die Substanzen als weniger zytotoxisch und somit weniger wirksam gegen verschiedene Tumorzellen; es konnte festgestellt werden, daß in Krebszellen, die mit Daunorubicin versetzt wurden, mehr Carbonylreduktasen gebildet werden, die Resistenz also zunimmt (SOLDAN et al., 1996; AX et al., 2000).

Die Anthrazykline haben zudem als eine der Nebenwirkungen eine kardiotoxische Wirkung auf den Herzmuskel. Die Reduzierung ihrer Keto-Gruppen zu Hydroxy-Gruppen spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung dieser Kardiotoxizität (BOUCEK et al., 1987; OLSON et al., 1988; CUSACK et al., 1993). In Untersuchungen mit transgenen Mäusen, die zum Teil herzspezifische humane Carbonylreduktase exprimierten, konnte dementsprechend nachgewiesen werden, daß die Carbonylreduktase exprimierenden Tiere schneller und umfangreichere Herzmuskelschäden davotrugen (FORREST & GONZALEZ, 2000).

#### **I. 4.           Schlußfolgerung**

Die beschriebenen Verhältnisse legen nahe, daß die Entwicklung eines bösartigen NNK-induzierten Tumors nicht allein von der NNK-Dosis abhängt. Von besonderer Bedeutung ist auch der individuelle und organspezifische Umfang der konkurrierenden Stoffwechselwege zur Aktivierung oder Inaktivierung von NNK, d.h. das Zusammenspiel der schädigenden Noxe NNK mit den metabolisierenden Enzymen der Cytochrom P 450-vermittelten  $\alpha$ -Hydroxylierung und der entsprechenden NNK-Aktivierung einerseits und den Enzymen der Carbonylreduktion im jeweiligen Gewebe oder Individuum andererseits. Letztere umfassen die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 und die cytosolische Carbonylreduktase als bedeutende Schritte der NNK-Entgiftung. Diese Vorgänge unterliegen wiederum endogenen und exogenen Einflüssen.

So dürften individuelle Unterschiede in der Menge und Zusammensetzung der beteiligten Enzyme allgemein eine bedeutende Rolle zur Bestimmung des persönlichen Risikos für ein tabakinduziertes Karzinom spielen (CARMELLA et al., 1995). Ferner kann von einer individuell unterschiedlichen Empfindlichkeit für tabakinduzierten Lungenkrebs ausgegangen werden (CASTONGUAY et al., 1983; LONDON et al., 1997). Auch Enzympolymorphismen sind als beeinflussende Faktoren denkbar, die in der Vergangenheit hauptsächlich in Bezug auf die Cytochrom P 450-vermittelte NNK-Aktivierung untersucht wurden, jedoch mit kontroversen Ergebnissen. Neuerdings treten Polymorphismen der NNK reduzierenden Enzyme in den Vordergrund.

## **I. 5. Zielsetzung der Arbeit**

Wie oben beschrieben, haben die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 und die cytosolische Carbo-nylreduktase eine herausragende Bedeutung im NNK-Stoffwechsel, der wiederum entscheidend an der Ätiologie des Bronchialkarzinoms beteiligt ist. Mit der vorliegenden Arbeit soll anhand von 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und dessen Entgiftungsstoffwechsel im menschlichen Körper, genauer im Lungengewebe, gezeigt und diskutiert werden, inwieweit eine interindividuell unterschiedliche Empfindlichkeit der Menschen für den meist tabakinduzierten Lungenkrebs und damit die Möglichkeit einer persönlichen Risikoeinschätzung vorliegt und welche Einflußfaktoren in Frage kommen.

Um das Vorkommen und die Aktivität der beiden Enzyme in menschlicher Lunge möglichst umfassend zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit Experimente gewählt, die es ermöglichen, interindividuelle Unterschiede der Enzyme auf genetischer (Expression) und zellphysiologischer (Menge, Aktivität) Ebene und auch eventuelle Hinweise auf Polymorphismen darzustellen. Damit ist der Nachweis einer unterschiedlichen Prädisposition für das Bronchialkarzinom denkbar. Vier Formen der Enzymdiagnostik fanden dabei Verwendung: eine Aktivitätsmessung in der Mikrosomen- und Cytosolfraktion, eine Aktivitätsmessung unter dem Einfluß spezifischer Inhibitoren, die RT-PCR und der ELISA.

## **II. Material und Methoden**

### **II. 1. Aufarbeitung von frischem Lungengewebe**

#### **II. 1. 1. Herkunft und Transport**

Nach Zustimmung der Ethikkommission des Klinikums der Philipps-Universität Marburg konnten Patienten mit operablen Lungenerkrankungen, weder alters- noch geschlechtsabhängig, ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie geben.

Die anamnestischen Daten der Patienten entstammen archivierten Akten und sind in Tabelle II. 1. dargestellt. Aus Datenschutzgründen wurden den Patienten Nummern zugeordnet.

Unmittelbar nach der operativen Entfernung durch die chirurgische Abteilung der Universitätsklinik wurde das gesunde Lungen- und gegebenenfalls auch das Tumorgewebe abgeholt; das Transportmedium war eisgekühlte 0,9% NaCl-Lösung.

#### **II. 1. 2. Vorbereitung des Gewebes für die Präparationen**

Die folgende Bearbeitung auf einer auf Eis liegenden Plexiglasplatte beinhaltete das Aufschneiden des Gewebes, das Abtrennen der Pleura mittels Skalpell und eine möglichst exakte Entfernung von Nahtmaterial, Klammern und gegebenenfalls des Tumors. Die Untersuchungen wurden an nicht-tumorösem Gewebe durchgeführt, das Tumormaterial bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für andere Experimente gelagert.

Instrumente und Arbeitsplatte waren zuvor in verdünnter Wasserstoffperoxidlösung gereinigt worden. Dieses Vorgehen verminderte die die RT-PCR behindernde Kontamination mit RNasen.

#### **II. 1. 3. Präparation der Proben für die RT-PCR**

Für die RNA-Analyse mittels RT-PCR wurden unter Zuhilfenahme einer anatomischen oder chirurgischen Pinzette Gewebestückchen, annähernd 50 mg entsprechend, heraus-

gezipft und nach kurzem Reinigen von Blut in isotonischer Kochsalzlösung in autoklavisierte RNase-freie Eppendorf-Cups gegeben, um anschließend in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt zu werden. Dabei galt es, durch zügiges Arbeiten, wie eben auch durch die wasserstoffperoxid-gereinigten Arbeitsmaterialien die RNA vor RNasen zu schützen.

#### **II. 1. 4. Präparation für die Bestimmung der Enzymkinetiken und den ELISA**

Die weitere Aufbereitung bestand in der Trennung der Zellfraktionen, die sich entweder an den letzten Schritt direkt anschloß oder sich nach Einfrieren des Gewebes bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu einem späteren Zeitpunkt durchführen ließ. Dabei wurden nach Möglichkeit mindestens  $2\text{ cm}^3$  des Gewebes mit 3-4 ml Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure (HEPES)-Pufferlösung pro Gramm homogenisiert.

Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

- 10 mM HEPES (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- 250 mM Saccharose
- Einstellung auf pH 7,4

Zunächst wurde das Gewebestück mit einer Schere in möglichst kleine Stücke geschnitten, gerade bedeckt vom Homogenisierungspuffer, um daraufhin mit dem Potter Elvehjem-Homogenisator mit Teflon-Pistill den nötigen Zellaufschluß zu erreichen. Grobe Bindegewebsanteile konnten der weiteren Fraktionstrennung mittels Abseien durch zweilagige Mullbinde entzogen werden.

Tabelle II. 1.: Übersicht der Patientenanamnesen

Patient	Geschlecht/ Alter (Jahre) im [Operations]jahr	Befund/ Klassifikation	Nikotinkonsum, Alkoholkonsum + Sonstiges	Beruf	Wichtige Vorer- krankungen	Familien- anamnese	Therapie	Radio-/Chemo- therapie, prä- bzw. postoperativ
1	m 47 [1998]	Plattenepithel-Ca re. Hauptbronch. G2 T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	1 Pckg./d über 30 Jahre 1 Fl. Bier/d	Installateur	sek. NNR-Insuf- fizienz → Cortisonther.  Hyperurikämie	Vater + Mutter: Apoplex	operativ, präoperative Radiochemother.	Cisplatin + Ifosfaamid; 10 meV Phot., Ges. herddosis 39,6Gy
2	m 78 [1998]	Plattenepithel-Ca re UL G2 T <sub>2</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub> (fokale Metapl.)	40-60 Zig./d bis ~1987	Bäckermeister	Chro. Bronchitis, Bluthochdruck, Z. n. Infarkt + Apoplex, Diab. mellitus II	k. A.	UL-Resektion + Lymphadenek- tomie	k. A.
3	m 48 [1998]	Keine Akte ver- fügbar						
4	m 55, †: 56 [1999]	Adeno-Ca li OL G2-G3	Raucher bis ~7/98, Menge nicht bekannt	Werkzeug- macher	Bluthochdruck, Z. n. Uleus duodeni – Op, NNR-insuff. (metastasenbed.)	k. A.	Keilexzision aus Primärtumor, adjuvante Radiochemother.	3 Zyklen Carboplatin, Ifosfaamid, Fortecortin, Uromitixan; 37,5 - 63 Gy
5	m 22 [1998]	Spontanpneumo- thorax re. bei Bullae; kein Entz.-, kein Tumor-Zeichen	k. A.	k. A.	2 x Spontan- pneumothorax	k. A.	Lu-Spitzenre- sektion, Pleurodese	k. A.
6	m 58 [1998]	squamoses Adeno-Ca, li OL + Wandinfiltr. G3 pT <sub>3</sub> , N <sub>0</sub> , M <sub>0</sub>	20-40 Zig./d über 32 J., bis 1998	Autoschlosser	Z. n. Mundboden -Ca + Zungen- teileresektion	k. A.	ÖL-/Thorax- wand- Resektion (Radiother. Bei Rezid.n. 5 Mon.)	(Rezidiv: Ges. herddosis 45 Gy)



Patient	Geschlecht/ Alter (Jahre) im [Operationsjahr]	Befund/ Klassifikation	Nikotinkonsum, Alkoholkonsum + Sonstiges	Beruf	Wichtige Vorerkrankungen	Familien- anamnese	Therapie	Radio-/Chemo- therapie, prä- bzw.
7	w 71 [1999]	peripheres, adenosquamoses Ca, re OL G2 pT <sub>1</sub> , pN <sub>0</sub> , pM <sub>x</sub>	nein	Hausfrau	V.a. KHK, Struma nodosa, Leberhämatom, U. V. M. Divertikolose	k. A.	OL-Resektion	k. A.
8	w 68 [1999]	Keine Akte verfügbar						
9	m 71 [1999]	kleinzell. Br. Ca. li OL; very limited disease pT <sub>1</sub> , N <sub>1</sub>	10-15 Zig./d Jahre '44 bis '88 ab 88 2-3 Zig./d	Baumaschinen- verkäufer	PAVK, Z.n. Herzinfarkt 88, COPD, CVI U. V. M.	k. A.	OL-Resektion li + Lymphaden- ektomie, postoperative Chemotherapie	s. Therapie
10	m 62 [1999]	Keine Akte verfügbar						
11	m 49 [1999]	adenosquamoses Ca G3 pT <sub>2</sub> , N <sub>0</sub>	60-80 Zig./d über >35 J.	Programmierer	Adeno-Ca de Ösophagus (G3), pAVK, Bluthochdruck, tiefe Beinv. Thro.	Vater + Bruder: Herzinfarkt	OL-Resektion, Lymphaden- ektomie	k. A.
12	m 67, †: 67 [1999]	peripheres Adeno-Ca re OL G2 pT <sub>2</sub> , N <sub>0</sub>	10 Zig./d	Lebensmittel- kaufmann	pAVK, Bluthochdruck, Z. n. Apoplex, Z. n. Magenres., Divertikulitis . . .	k. A.	OL-Resektion, Lymphaden- ektomie	k. A.

Patient	Geschlecht/ Alter (Jahre) im [Operationsjahr]	Befund	Nikotinkonsum, Alkoholkonsum + Sonstiges	Beruf	Wichtige Vorer- krankungen	Familien- anamnese	Therapie	Radio-/Chemo- therapie, prä- bzw.
13	m 69 [1999]	adenosquamöses Ca G2 pT <sub>1</sub> , pN <sub>0</sub> , pM <sub>1</sub> + Tumor li UL	10 Zig./d	Werkzeugmacher	Beinvenen- thrombose, erosive Antrungastritis	Mutter: Uterus- und Schilddr.-Ca Vater: Lungen Ca (Staublunge)	Teilresektion li OL	k. A.
14	m 62 [1999]	Keine Akte ver- fügbar						
15	m 69 [2000]	Keine Akte ver- fügbar						
16	m 48 [2000]	Leiomyom li (nicht maligne),	k. A.	Heizungsbauer	COPD, Adipositas, Duodenitis, Schilddr. adenom Z.n. Vv. thromb.	k. A.	atypische Keilresektion	k. A.
17	m 60 [2000]	pleom. sarkomat. +karzinomatöses Ca + fok. neuroid. Diff., infiltr., G4 pT <sub>3</sub> , pN <sub>1</sub>	20 Zig./d über 20 J. 15 J. Asbest- exposition	k. A.	Bluthochdruck, Z. n. TIA, Diab. mellitus m. term. Nierenins., Z. n. Prostata-Ca	k. A.	palliative Pneu- monektomie + Wandresektion, (ggf. postoper. Chemother.)	(postoper. Che- motherapie nur bei klarem histol. Befund)

In dieser Übersicht sind relevante Patientendaten enthalten, sofern die Akten, die vom Archiv des Klinikums Marburg zur Verfügung gestellt wurden, vollständig waren. Die Angaben zur Dauer des Tabakkonsums beziehen sich auf die Operationsdaten zwischen den Jahren 1998 und 2000.

Die Zellfraktionen ließen sich nach folgendem Zentrifugationsschema trennen:

- Nach 10 Minuten Zentrifugation bei  $750 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hatten sich die Kerne abgesetzt. (Zentrifuge: Heraeus-Tischzentrifuge ).
- Mit weiteren 10 Minuten bei  $8500 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ließen sich die Mitochondrien abtrennen. (Zentrifuge: Heraeus-Tischzentrifuge ).
- Die Ultrazentrifugation des Überstandes für 75 Minuten bei  $150000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  erbrachte schließlich eine Trennung der Mikrosomen vom Cytosol als Überstand. (Zentrifuge: Beckmann Ultrazentrifuge L7-55).

Das abgesetzte Sediment, also das Mikrosomen-Pellet, wurde je nach Menge mit 500-1000  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Aufbewahrung aller Fraktionen erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bis Mikrosomen und Cytosol für die Untersuchung der Enzymkinetik oder den ELISA verwendet wurden.

## **II. 2.        Ermittlung der Enzymkinetiken**

### **II. 2. 1.     Allgemeines**

In dieser Arbeit wurde der enzymatische Umsatz von NNK zu NNAL in menschlichem Lungengewebe bestimmt; dazu diente die Mikrosomenfraktion (Umsatz vorwiegend durch  $11\beta\text{-HSD 1}$ ) und das Cytosol (Umsatz vorwiegend durch Carbonylreduktase). Der Versuchsablauf war für beide Fraktionen mit Ausnahme der im Folgenden erwähnten Abweichungen gleich.

### **II. 2. 2.     Inkubation der Zellfraktionen**

Um die Umsatzkapazität der  $11\beta\text{-HSD 1}$  und der Carbonylreduktase interindividuell vergleichen zu können, mußte ein einheitliches, dem menschlichen Organismus möglichst angeglichenes Reaktionsmilieu geschaffen werden.

Dies geschah mit einem Inkubationsansatz von 50  $\mu$ l, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 10  $\mu$ l 10 mM Phosphatpuffer (1,38 g Natriumdihydrogenphosphat auf 1 Liter Wasser; Einstellung auf pH 7,4); bei Verwendung von 30  $\mu$ l Cytosol entfiel dieser Schritt (Gesamtvolumen: 50  $\mu$ l).
- 10  $\mu$ l NNK-Lösung (NNK-Pulver, gelöst in 10 mM Phosphatpuffer; Campro Scientific, Emmerich).
- 10  $\mu$ l NADPH-regenerierendes System (siehe unten)
- 20  $\mu$ l Mikrosomen oder 30  $\mu$ l Cytosol

Die NNK-Lösung wurde in sechs Konzentrationen hergestellt, mit Endkonzentrationen von 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM. Bei niedriger Aktivität wurde gegebenenfalls nur mit Konzentrationen größer als 0,5 mM nachinkubiert.

Das regenerierende System hatte die Aufgabe, das Enzym nach Reduktion von NNK zu NNAL durch Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH wieder reaktionsfähig zu machen; es bestand aus:

- 0,8 mM NADP
  - 6 mM Glucose-6-Phosphat (Boehringer Mannheim, Mannheim)
  - 0,35 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Boehringer Mannheim, Mannheim)
  - 3 mM  $MgCl_2$
- zusammen gelöst in
- 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4

Sofern es die Mikrosomen- und Cytosolmengen erlaubten, wurden für jede NNK-Konzentration vier Ansätze hergestellt. Zum Nachweis einer eventuellen nicht-enzymatischen NNK-Carbonylreduktion wurden Kontrollexperimente mit Leerwerten, d.h. Inkubationsansätzen mit Phosphatpuffer statt Zellfraktionen, durchgeführt.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und dauerte für Mikrosomen 30 Minuten, für Cytosol 60 Minuten. Die Zeit ließ sich variieren, da der NNK-Umsatz unter den geschilderten

Bedingungen deutlich länger als eine Stunde linear verläuft, wie im Rahmen anderer Fragestellungen in der Arbeitsgruppe um Prof. Maser mehrfach gezeigt werden konnte. 150 µl eisgekühltes Acetonitril stoppten die enzymatische Reaktion nach Ablauf der angegebenen Zeit. Es schloß sich die Abzentrifugation des Überstandes bei  $20000 \times g$  (Heraeus Biofuge 15R) für 5 Minuten an.

Die Proben waren sofort oder nach kurzer Aufbewahrung bei  $-80\text{ °C}$  mit der HPLC zu messen.

### **II. 2. 3. HPLC**

#### **II. 2. 3. 1. Überblick**

Bei der HPLC („high performance liquid chromatography“ = Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) handelt es sich um eine Form der Säulenchromatographie. Die Komponenten dieses Systems sind eine Pumpe zum forcierten Transport der mobilen Phase (Fließmittel), ein Injektor zur Applikation der Probe, eine Säule zur Trennung von Substanzen und ein Detektor, der über einen Signalumwandler an einen Schreiber gekoppelt ist.

Die stationäre Phase der Säule bedingt bei der HPLC eine besonders hohe Trennleistung aufgrund der geringen Partikelgröße (hier  $5\text{ }\mu\text{m}$ ). Diese hohe sogenannte Packungsdichte macht die oben erwähnte Pumpe erforderlich, die Drücke bis zu 400 bar aufbaut und so Flußraten von  $0,1 - 10\text{ ml/min}$  ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Substanztrennung die sogenannte Reverse-Phase-Chromatographie eingesetzt, bei der eine unpolare, lipophile stationäre Phase (alkylierter Kieselgel) die Stoffe mit hoher Polarität zuerst eluieren läßt.

Das beschriebene Prinzip der HPLC als Säulenchromatographie wurde mittels folgender Apparaturen umgesetzt:

- Autosampler: AS-100 HRCL (BIO-RAD, Californien, USA) zur Probenaufbewahrung während der Messung und zur Injektion unter Kühlung
- Pumpe: Knauer, Berlin

- Säule: LiChro CART<sup>®</sup> 250-4 HPLC Cartridge; Füllung: LiChropher<sup>®</sup> 100 RP 18 (5 µm) (Merck, Darmstadt)
- UV-Detektor: L-4000 A UV Detector (Merck, Darmstadt)
- Drucker und Integrator: Integrator C-R6A (Shimadzu)

### II. 2. 3. 2. Meßverlauf

NNAL und NNK besitzen aufgrund ihrer ähnlichen Molekülstruktur keine weit auseinanderliegenden Retentionszeiten: NNK eluiert bei einer Flußrate von 0,5 ml/min nach ca. 11 Minuten und NNAL nach ca. 6,8 Minuten (MASER, 1998). So konnte der chromatographische Lauf mit einer isokratischen Elution durchgeführt werden, d.h., daß eine Pumpe und ein Fließmittel ausreichten; letzteres bestand aus:

- 10 mM Natrium-Phosphatpuffer mit pH 7,4, in gefiltertem Wasser (Mikropore-Wasserfilter)
- 25% Acetonitril

Abschließend erfolgte eine 15-minütige Entgasung durch Ultraschall.

Die Zeiteinheit für eine Messung betrug 20 – 30 Minuten. Die UV-Detektion erfolgte bei dem Absorptionsmaximum von NNAL, einer Wellenlänge von 230 nm, und einer Empfindlichkeit von 0,01. Das Signal wurde von einem angeschlossenen Integrator als Peak aufgezeichnet und dessen Fläche integriert.

### II. 2. 3. 3. Eichung und Auswertung

Die Auswertung der je nach Retentionszeit und Substratmengen (NNK) entstehenden integrierten Peak-Flächen setzte eine Eichreihe mit bekannten NNAL-Mengen voraus (NNAL wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Hoffmann, American Health Foundation, Valhalla, USA). Unter identischen Meßbedingungen wurden zu diesem Zweck Konzentrationen von 0,15 µg/µl, 0,3 µg/µl, 0,6 µg/µl, 1,2 µg/µl und 3 µg/µl gewählt; 3 µg entsprechen 1,44078 nmol NNAL. So konnten die Flächen der NNAL-

Peaks in die entsprechende Menge des umgesetzten Substrats umgerechnet werden. Die Berechnung und die lineare Darstellung der Eichreihe erfolgte mit dem Programm „Graphpad, prism2“. Dieses diente ebenso der Bestimmung und der graphischen, nicht-linearen, Abbildung der spezifischen Enzymaktivität, also der Menge des entstandenen Metaboliten NNAL pro Minute und mg Protein, abhängig von der eingesetzten NNK-Menge. Dazu war außerdem die im folgenden beschriebene Proteinbestimmung von Mikrosomen und Cytosol erforderlich.

## **II. 2. 4. Proteinbestimmung nach Bradford**

### **II. 2. 4. 1. Überblick**

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD, 1976) bindet der eingesetzte Farbstoff Coomassie Blue G-250 an Proteine und hat außerdem die Eigenschaft, in saurer Lösung eine rot-braune Farbe (Absorptionsmaximum 465 nm) und in seiner anionischen Form eine blaue Farbe (Absorptionsmaximum 595 nm) anzunehmen. Gibt man Protein zu der sauren, rotbraunen Lösung, wird der Farbstoff in seiner anionischen Form stabilisiert (Farbumschlag zu blau); dem liegen ionische Wechselwirkungen mit Argininen, Histidinen, Lysinen und aromatischen Aminosäuren zugrunde. Ein Vorteil der Methode ist, daß man mit geringen Proteinmengen auskommt. Nachteilig kann sich auswirken, daß die Bindekapazität verschiedener Proteine für Coomassie Blue G-250 variiert. So bedingt BSA (bovines Serumalbumin) sehr hohe Absorptionswerte. Für die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen wirkte sich dies jedoch nicht negativ aus.

Reagenzien:

- BSA-Lösung (500 mg/ml), Boehringer Mannheim
- Bradford-Fertiglösung, mit Wasser verdünnt (1 : 4)

Fertiglösung: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Blue G) werden in 50 ml 95% Ethanol und 100 ml 85% Phosphorsäure vollständig gelöst, um anschließend mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt zu werden.

Meßgerät:

- Uvikon Spectrophotometer 930 (Kontron Instruments, Mailand, Italien)

#### **II. 2. 4. 2. Erstellung einer Eichreihe**

Von der BSA-Lösung (500 mg/ml) waren 5, 10, 15, 20 und 25 µl abzunehmen und mit Bradford-Lösung auf 1 ml aufzufüllen, entsprechend einem Gehalt von 2,5, 5, 7,5, 10 und 12,5 mg. Nach der Kalibrierung des Gerätes mit einem Leerwert (Wasser : Bradford-Lösung = 1 : 40, d.h. 25 ml Wasser und 975 µl Bradford-Lösung) erfolgten für jede Konzentration mindestens drei photometrische Absorptions-Messungen bei 595 nm.

#### **II. 2. 4. 3. Erstellung der Probenreihe**

Nach einer Verdünnung der zu messenden Proben im Verhältnis 1 : 40 - 5 µl Probe in 195 µl destilliertem Wasser - wurden hiervon jeweils 25 µl mit Bradford-Lösung auf 1 ml aufgefüllt. Für die spätere Auswertung ergab sich durch letzteren Schritt ein weiterer Verdünnungsfaktor von 40.

Wieder erfolgten mindestens drei Messungen mit dem Photometer bei 595 nm.

Der erste Verdünnungsschritt ließ sich bei zu niedrig (<100) oder zu hoch (>1000) gemessenen Absorptionen mit einer entsprechenden Verdünnung modifizieren: 1 : 20 (Absorption steigt) oder 1 : 80 (Absorption sinkt).

#### **II. 2. 4. 4. Auswertung**

Das Programm „Graphpad, prism2“ kann mit den Konzentrationen der Eichreihe als x-Werte und den Absorptionen als y-Werte (y1 – y3) eine Eichgerade erstellen und den für die Proben gemessenen Absorptionswerten (y1) die entsprechende Konzentration (x) zuordnen, deren Maßeinheit in mg/ml anzugeben war.



## **II. 3. RT-PCR**

### **II. 3. 1. Allgemeines**

Die PCR („polymerase chain reaction“ = Polymerasekettenreaktion) ermöglicht es, einen kurzen, definierten Abschnitt der DNA oder RNA so zu kopieren und zu vervielfältigen, daß er weiteren Analyse-Verfahren zur Verfügung steht (vgl. Kapitel II. 3. 4. 1.). Im folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte in ihrer Reihenfolge für die RT („reverse transcriptase“ = Reverse Transkriptase) -PCR dargestellt.

### **II. 3. 2. RNA-Isolierung**

Aus den in Kapitel II. 1. 3. beschriebenen tiefgefrorenen Gewebestücken wurde zunächst die RNA mit dem RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (Quiagen, Hilden) isoliert.

Materialien:

- Mörser und Pistill
- 70% Ethanol
- $\beta$ -Mercaptoethanol (14,5 M) ( $\beta$ -ME) (Merck, Darmstadt)
- Ribonukleaseinhibitor (MBI Fermentas, Litauen)

Kit-Inhalt:

- Silicasäulen
- Sammel-Cups
- RLT-Puffer (Lysepuffer)
- RW1-Puffer (Waschpuffer)
- RPE-Puffer (Waschpuffer), zu verdünnen mit 96-100% Ethanol (1 : 5)
- RNase freies Wasser

Zum Gewebeaufschluß wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben in flüssigem Stickstoff im Mörser mit dem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Vorkühlen des Mörsers, des Pistills und der verwendeten Spatel verhinderte ein vorzeitiges Auftauen

der Probe und damit eine Erhöhung der Aktivität von RNasen. Nach gewichtsabhängiger Zugabe von RLT-Lösungs-Puffer ( $> 40$  mg Pulver:  $\geq 600$  ml Lysepuffer;  $< 40$  mg Pulver: 350 ml Puffer), der Guanidiniumthiozyanat-Hochsalz-Lösung enthält, und Zusatz von  $\beta$ -ME (10  $\mu$ l auf 1 ml Puffer) erfolgte die Homogenisierung des Gewebes mit Kanüle (maximal 0,9 mm Durchmesser) und Spritze durch mehrmaliges Aufziehen des Lysats; Guanidiniumthiozyanat wird zur Denaturierung von Proteinen verwendet, so daß beispielsweise RNA in Gegenwart von Ribonukleasen ohne nukleolytischen Abbau erhalten bleibt und somit vor RNasen geschützt ist. Nach 3 Minuten Zentrifugation bei  $20000 \times g$  (Heraeus Biofuge 15R) wurde ein 1 : 1-Gemisch des Lysats mit 70%-iger Ethanollösung auf die Silicasäulen aufgetragen, welche RNA binden. Die übrigen Puffer dienten dem Herunterwaschen von Proteinen und Desoxyribonukleinsäuren von der Säule.

Die Waschfolge war: Zweimal 15 Sekunden Zentrifugation bei  $8000 \times g$  mit je 700  $\mu$ l RW1-Puffer, zweimal 15 Sekunden Zentrifugation bei  $8000 \times g$  mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer, 2 Minuten Zentrifugation bei  $20000 \times g$  mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer; letzterer bewirkt in Kombination mit Ethanol die Elimination von verbliebenen Guanidiniumthiozyanat-Salzen aus der Säule. Es schloß sich das Eluieren der RNA mit 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser bei  $8000 \times g$  für 1 Minute an.

Die RNA-Lösung wurde nach Zugabe von 10 vol % Ribonukleaseinhibitor bis zum weiteren Gebrauch bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

(Der RNase-Inhibitor war wie folgt zusammengesetzt: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,2 mM EDTA, 0,1 mg/ml BSA, 100 ng/ml RNase A, 0,1 mg/ml E.coli $^{[3}\text{H}$ ]-RNA, 50 mg/ml Hefe-RNA, 8 mM DTT gelöst in 25 mM Tris-phosphat (pH 7,5), 50 mM NaCl, 8 mM DTT, 0,5 mM ELUGENT Detergenz und 50% Glycerol.)

Die Zentrifugationen erfolgten stets unter Kühlung durch die Zentrifuge.

### **II. 3. 3. RNA-Mengen-Messung und Reinheitsbestimmung**

5  $\mu$ l des RNA-Eluats wurden auf RNA-Reinheit und -Gehalt überprüft. Dazu fand ein Spektrophotometer (Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in Kombination mit einer Quarzglas-Küvette (Schichtdicke 5mm) Verwendung. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte bei einer Verdünnung von 1 : 10 mittels Absorptions-

messung bei 260 nm, da RNA Licht dieser Wellenlänge am stärksten absorbiert; dabei entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA, so daß sich der tatsächliche RNA-Gehalt in µg/ml berechnen läßt. DNA und Proteine absorbieren Licht mit der Wellenlänge 280 nm stärker als solches mit 260 nm. Der Quotient aus Absorption bei 260 nm und Absorption bei 280 nm ergibt die sogenannte „ratio“ als Reinheitsindikator. Bei Ratio-Werten von 1,7 bis 2,1 wird von einer reinen RNA-Präparation ausgegangen. Zur weiteren Bearbeitung mit der RT-PCR wurden also Proben mit einem Reinheitsquotienten ab 1,7 verwendet.

## **II. 3. 4. RT-PCR von 11β-HSD 1 und Carbonylreduktase**

### **II. 3. 4. 1. Überblick**

Zunächst folgt eine kurze Darstellung des prinzipiellen Ablaufs einer PCR zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten: Initial ist eine Trennung der DNA-Stränge erforderlich; dies wird durch Hitzedenaturierung erreicht. Anschließend lagert sich an jedem Strang, „Template“ (Vorlage) genannt, in 5′-3′-Richtung ein kurzer komplementärer Oligonukleotidkomplex von 20 – 40 Nukleotiden Länge und mit einem freien 3′-OH-Ende an („Annealing“) - auf den jeweils anderen zulaufend. Beide dienen als „Primer“ (Starteinheit) der DNA-Synthesereaktion, d.h. der Polymerisierung, und begrenzen die gewünschten Abschnitte der Stränge. Die im PCR-Reaktionsansatz (siehe unten) vorhandene Taq-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym, das von dem in über 70 °C heißen Quellen lebenden Bakterium „*Thermus aquaticus*“ stammt, synthetisiert aus freien Desoxynukleotidtriphosphaten (dTNP) neue komplementäre Stränge (Extension, Hybridisierung).

Die Schritte Denaturierung, „Annealing“, Hybridisierung und Synthese werden mehrfach wiederholt und ergeben eine millionenfache Anzahl an DNA-Fragmenten. Dieses PCR-Produkt läßt sich mit einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel nach der Elektrophorese als Bande nachweisen.

Die RT-PCR unterscheidet sich von diesem Ablauf lediglich im Anfangsstadium. Man setzt zunächst reverse Transkriptase (gewonnen aus Viren) ein, die die vorhandenen

mRNA-Stränge in einzelsträngige cDNA („complementary/coding DNA“) umschreibt, die dann als „Template“ fungiert. Mit Hilfe der Primer, der Taq-Polymerase und den dTNPs nimmt die Reaktion den geschilderten Verlauf der PCR. Es ist anzunehmen, daß die Menge des PCR-Produkts, das proportional zur mRNA-Matrize sein soll, die Höhe der Expression des zugehörigen Gens widerspiegelt.

#### **II. 3. 4. 2. Herstellung des Reaktionsansatzes**

In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-PCR mit „Ready-To-Go<sup>TM</sup> RT-PCR beads“ (Amersham Pharmacia Biotech) ausgeführt.

Ein Reaktionsansatz (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

- bead (=Perle), Bestandteile: siehe unten
- RNase freies Wasser (50 µl - 2 µl (Primer) - X µl RNA-Lösung), steril, versetzt mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) zur Inaktivierung von RNasen
- Primer (2 µl), 3'+5' - Gemisch (Aufbau siehe unten)
- RNA-Lösung (entsprechend 1 µg RNA)

Bead-Bestandteile:

- ~2,0 Einheiten Taq-DNA-Polymerase
- 10 mM Tris-HCl
- 60 mM KCl
- 1,5 mM Mg Cl<sub>2</sub>
- 200 µM jeder dTNP
- „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MuLV) - Reverse Transkriptase (FPLCpure<sup>®</sup>)
- RNAGuard<sup>®</sup> Ribonuklease-Inhibitor (vom Schwein) und Stabilisatoren, einschließlich RNase/DNase-freies BSA

Nach Zufügen der errechneten Wassermenge (siehe oben), wurden die Primer (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) hinzugegeben. Synthetisiert und lyophilisiert mußten sie zum Arbeiten in sterilem DEPC-Wasser in Lösung gebracht werden, so daß sich 50

pmol/ml ergaben. Um 10 pmol/ml für den PCR-Ansatz zu erhalten, wurden vom 3'-und vom 5'-Primer je 10 µl genommen und mit 30 µl Wasser vermischt. Es schloß sich die Zugabe der Menge RNA-Lösung an, die 1 µg RNA entsprach.

Für jede Patientenprobe wurden drei PCR-Ansätze analysiert, jeweils auf 11β-HSD 1, Carbonylreduktase und β2-Mikroglobulin; da letzteres keine interindividuellen Unterschiede in der Expression zeigt, diente es als Interner Standard und wurde zur Kontrolle jeweils mit 11β-HSD 1 und Carbonylreduktase eingesetzt.

### **II. 3. 4. 3. Primerauswahl für reverse Transkription und PCR**

Das 11β-HSD 1 kodierende Primergemisch bestand aus 5'-Primer mit der Basensequenz: 5'-AAC TGA GGA AGT TGA CTT CCA-3' und aus 3'-Primer: 5'-GAA TTC AGA CCA GAG ATG CTC-3' (TANNIN, 1991).

Das Carbonylreduktase kodierende Primergemisch bestand aus 5'-Primer mit der Basensequenz: 5'-GGA GAG TGG TGA ACG TAT CTA G-3' und aus 3'-Primer: 5'-CTG TTC AAC TCT CTT CTC TGA A-3' (WERMUTH, 1988).

Das β2-Mikroglobulin kodierende Primergemisch bestand aus 5'-Primer mit der Basensequenz: 5'-TTC ACT CAA TCC AAA TGC CGC ATC TTC-3' und aus 3'-Primer: 5'-GTG GAG CAT TCA GAC TTG TCT TTC AGC-3'.

### **II. 3. 4. 4. Anmerkungen zur Primerauswahl**

Die verwendeten Primer entsprechen einer Reihe von Bedingungen, die für den erfolgreichen Ablauf der (RT-)PCR entscheidend sind. Im wesentlichen soll erreicht werden, daß die Synthese der DNA erfolgt, ohne daß dabei falsche oder zu viele Fragmente vervielfältigt werden.

Kriterien:

- Der Primer muß in 3'und 5'-Richtung komplementär zum Matrizenstrang sein.
- Das zu kopierende cDNA- Fragment soll von den Primern eingerahmt

werden.

- Der Abschnitt, der untersucht werden soll, ist idealerweise kleiner als 1 kb.
- Die Anzahl der Primernukleotide ist so hoch zu wählen, daß nur eine Hybridisierungsmöglichkeit im Genom besteht.
- Zu lange Primer verlangsamen die Hybridisierung (meist 17-28 Nukleotide)
- Die Primer sollten die gleiche Schmelztemperatur besitzen (zwischen 55 und 80°C).
- Ein ausgeglicheneres Verhältnis von G/C zu A/T ist erforderlich.
- Möglichst keine seltenen Basenfolgen wie poly-A- oder lange G/C-Abschnitte.
- Haarnadel-, d.h. Sekundärstrukturen, sowie die Möglichkeit von Dimerbildungen sollten vermieden werden.

#### **II. 3. 4. 5. Reaktionen im Thermocycler**

Für die RT-PCR wurde der „Omn-E Thermal Cycler“ (Hybaid, Middlesex, England) verwendet, der die Temperatureinstellung für Denaturierung (95 °C), Primeranlagerung (40 – 60 °C), Renaturierung und Synthese (72 °C) übernahm.

Die reverse Transkription von 1 µg RNA erfolgte für 30 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 95 °C.

Die sich anschließende PCR der cDNA für 11β-HSD 1 hatte als Zeit- und Temperaturfolge 45 Zyklen für je 45 Sekunden bei 95 °C, 45 Sekunden bei 60 °C und 1 Minute bei 72 °C. Den Abschluß bildeten 5 Minuten bei 72 °C.

Die Zyklusfolge für Carbonylreduktase bestand aus 40 Zyklen für je 1 Minute bei 95 °C, 1 Minute bei 60 °C und 1 Minute bei 72 °C. Den Abschluß bildeten 10 Minuten bei 72 °C.

Für β2-Mikroglobulin konnten beide Zyklen eingesetzt werden.

## II. 3. 4. 6. Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Zur Interpretation und Quantifizierung der PCR-Produkte fand in dieser Arbeit die Agarose-Gelelektrophorese Verwendung, bei der die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren im elektrischen Feld dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte proportional ist.

Mit einer 100 bp (Basenpaare) starken DNA-Leiter, Konzentration 0,5 mg/ml (peqlab, Erlangen), mit Bromphenolblau-Probenpuffer im Verhältnis 1 : 6 verdünnt, konnten die Banden den entsprechenden PCR-Produkten zugeordnet werden: Die 11 $\beta$ -HSD 1-cDNA bestand aus 395 bp, die Carbonylreduktase-cDNA aus 409 bp, der interne Standard aus 200 bp. Zunächst erfolgte das Gießen des Gels. Dazu wurden 3 g Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) in 100 ml TAE-Elektrophoresepuffer gelöst, um danach für 3 Minuten zum Kochen gebracht zu werden.

Der TAE-Puffer (50  $\times$ ) bestand aus:

- 2 M Tris Base (Tris (hydroxymethyl) aminomethan)
- 5,7% Essigsäure
- 50 mM EDTA
- EDTA ist vor Mischung bei pH 8 zu lösen

Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 5  $\mu$ l einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Dieser interkalierende Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an Nukleinsäuren an, so daß die Banden in UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten. Das entstandene Gemisch wurde zum Gelieren in eine Elektrophorese-Flachbettkammer gegeben und mit zwei Kämme versehen, die die Probenkammern entstehen ließen. 45 Minuten später hatte das Gel die für die Elektrophorese erforderliche Festigkeit. Nach Übersichtung mit Elektrophoresepuffer (siehe oben) wurden die Probenkammern mit jeweils 20  $\mu$ l des folgenden Gemischs gefüllt: 4  $\mu$ l Ladepuffer, bestehend aus Probenpuffer und Bromphenolblau (peqlab, Erlangen) als Farbstoffmarker für den Lauf und 20  $\mu$ l der in der RT-PCR entstandenen patientenspezifischen cDNA-Lösung. Schließlich folgte das Anlegen der Spannung (130 Volt).

Zur weiteren Auswertung mittels Photographie der fluoreszierenden Banden diente der Image Master<sup>®</sup> VDS und das Programm „Image Master“ (beide von Pharmacia Biotech).

## **II. 4. ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay**

### **II. 4. 1. Allgemeines**

Der ELISA wurde in dieser Arbeit mit der sogenannten „Sandwich“-Technik durchgeführt. Es sollte so die in Lungenmikrosomen exprimierte 11 $\beta$ -HSD 1 nachgewiesen werden. Die Aufbereitung der Mikrosomenfraktion ist bereits in Kapitel II. 1. 4. beschrieben.

Der entsprechenden immunologischen Reaktion dienten insgesamt drei Antikörperlösungen, eine 11 $\beta$ -HSD-Kontroll-Antigenlösung und die zu messenden Mikrosomen-Fraktionen, die aus dem oben beschriebenen Zellaufschlußverfahren gewonnen wurden.

Das untenstehende Schema (Abbildung II. 1.) verdeutlicht das Vorgehen bei der Durchführung eines Sandwich-ELISA.

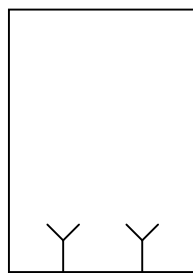
### **II. 4. 2. Reaktionsbedingungen und -abfolge auf der Mikrotiterplatte**

#### **II. 4. 2. 1. Erster Antikörper**

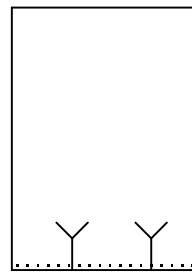
Im ersten Schritt war der erste Antikörper an die Plattenstruktur zu binden, indem die Kavitäten („wells“) einer 96 Kavitäten-Mikrotiterplatte mit je 50  $\mu$ l der Antikörperlösung gegen 11 $\beta$ -HSD 1 befüllt wurden. Sie stammte, als Antiserum gereinigt mittels NHS-aktivierter Sepharose-Säule (NHS = N-Hydroxysuccinimid), aus einem weiblichen, weißen Kaninchen (BLUM et al., 2000) und kam verdünnt in PBS-Puffer im Verhältnis 1 : 500 zur Anwendung.

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

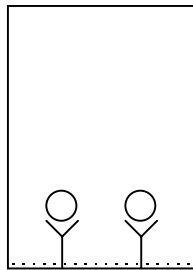


**Sandwich-ELISA**

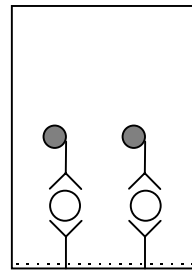
1.) Erster Antikörper:  
Immunglobulin gegen  
 $11\beta$ -HSD 1.



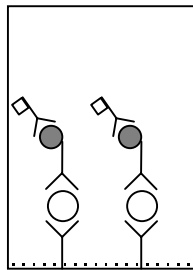
2.) Unspezifische  
Bindungsstellen  
werden geblockt.



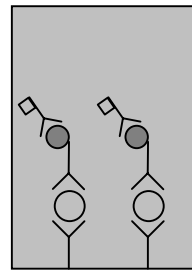
3.) Antigen:  
rekombinante  
 $11\beta$ -HSD 1.



4.) Zweiter Antikörper:  
Immunglobulin gegen  
 $11\beta$ -HSD 1, markiert  
mit Biotin.



5.) Dritter Antikörper:  
Immunglobulin gegen  
Biotin, assoziiert mit  
Peroxidase.



6.) Farbreaktion  
der Peroxidase.

Abb. II. 1.: Schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISA

**II. 4. 2. 2. Blockung**

Anschließend wurden die überzähligen Bindungsstellen in den Wells blockiert. Als Blockierungspuffer dienten in jeder Position 200  $\mu$ l PBS-Puffer versetzt mit 3% BSA (bovines Serumalbumin).

Diese Reaktion fand für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt.

### **II. 4. 2. 3. Antigen**

Der dritte Schritt beinhaltete das Auftragen der Antigenlösungen. Als Referenz zur 11 $\beta$ -HSD 1-Konzentrationsbestimmung wurde rekombinante 11 $\beta$ -HSD 1 eingesetzt, verdünnt in PBS-Puffer mit 1% BSA in sechs Verhältnissen 1 : 6,25 bis 1 : 200. In den Mikrosomen des humanen Lungengewebes war das eigentliche Antigen enthalten. Für jeden Patienten erfolgten die Reaktionen in drei Wells.

Dabei wurde ein Teil der Wells (z.B. die Außenrand-Wells) nicht mit Antigen beschickt und diente somit als Negativkontrolle.

Die Inkubation dauerte zwei Stunden bei Raumtemperatur.

### **II. 4. 2. 4. Zweiter Antikörper**

Im vierten Schritt lagerte sich der oben genannte 11 $\beta$ -HSD 1 - Antikörper, mit Biotin markiert, an die Antigene an. Die Biotin-Markierung erfolgte nach dem Protokoll des Immunoprobe™ Biotinylation Kit (Sigma, USA). Es wurden pro Well 50  $\mu$ l der Antikörperlösung verwendet, verdünnt im Verhältnis 1 : 500 in PBS-Puffer mit 1% BSA.

Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur oder dauerte eine Nacht bei 4 °C.

### **II. 4. 2. 5. Dritter Antikörper**

Schließlich folgte die Zugabe des dritten Antikörpers, 50  $\mu$ l pro Kavität, Kaninchen-Immunglobuline gegen Biotin (DAKO A/S, Dänemark), assoziiert mit Meerrettich-Peroxidase („horse raddish peroxidase, HRP“) und verdünnt im Verhältnis 1 : 500 in PBS-Puffer mit 1% BSA .

Die Inkubation fand wiederum für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt.

#### II. 4. 2. 6. Farbentwicklung und ihre Messung

Um eine quantifizierbare Farbreaktion mit HRP zu erhalten, wurde ABTS (2,2'-Azo-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Schwefelsäure)) verwendet; 50 mg waren gelöst in 100 ml Citrat-Puffer mit der Zusammensetzung:

- 0,1 M Zitronensäure
- 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat
- Einstellung auf pH 7,4

Die angegebene Menge wurde mit 30 µl 30%-iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt oder bei veränderter Menge mit dem entsprechenden Teil davon.

Jede Kavität war mit 200 µl dieser Lösung zu füllen.

Nach etwa 50 Minuten konnten die Absorptionen in den einzelnen Kavitäten mit dem „microplate reader“ (Mikrotiterplatten-Lesegerät), BIO-RAD, bei 405 nm gemessen werden.

Zur endgültigen Konzentrationsbestimmung waren zuvor Proteinbestimmungen (Methode nach Bradford, siehe oben) von Referenz- und Patientenlösung durchgeführt worden.

Der quantitativen Auswertung diente nach der Proteinbestimmung der Antigenlösungen das Programm EXCEL von Microsoft.

#### II. 4. 3. Waschvorgang

Nach jedem Schritt erfolgte das Herunterwaschen der jeweiligen Lösung durch mehrmaliges Spülen mit PBS-Puffer („phosphate buffered saline“).

Der PBS-Puffer bestand aus:

- 0,138 M NaCl
- 10 mM Natriumdihydrogenphosphat
- 2,7 mM KCl
- 0,005% TWEEN als Detergenz

## II. 5. Inhibitoruntersuchung

Die Zellfraktionen des Lungengewebes, Mikrosomen und Cytosol (vgl. Kapitel II. 1. 4.) wurden zusätzlich zu den Aktivitätsmessungen (vgl. Kapitel II. 2.) auf ihre Sensitivität gegenüber spezifischen Enzyminhibitoren untersucht, um auch hierin interindividuelle Unterschiede nachzuweisen. Die Mengen der Patientenproben der vorangegangenen Untersuchungen reichten größtenteils nicht für dieses Experiment aus, so daß auf Proben zurückgegriffen wurde, die sonst nicht Bestandteil der Arbeit waren.

Als Hemmstoff der 11 $\beta$ -HSD 1 wurde Glycyrrhetinsäure und als Hemmstoff der Carbo-nylreduktase wurde Rutin eingesetzt.

Der Versuchsansatz setzte sich entsprechend der Aktivitätsmessung wie folgt zusammen:

- 10  $\mu$ l Inhibitorlösung (1 mM Glycyrrhetinsäure bzw. 0,1 mM Rutin gelöst in 10 mM Phosphatpuffer)
- 10  $\mu$ l NNK-Lösung (NNK-Pulver, gelöst in 10 mM Phosphatpuffer, Campro Scientific, Emmerich)
- 10  $\mu$ l NADPH-regenerierendes System
- 20  $\mu$ l Mikrosomen oder 30  $\mu$ l Cytosol

Bei Zugabe von 30  $\mu$ l Cytosol kamen 5  $\mu$ l NNK-Lösung und 5  $\mu$ l regenerierendes System zum Einsatz, um die Ansatzmenge von 50  $\mu$ l konstant zu halten. Für jede Patientenprobe wurden Vergleichsmessungen ohne Inhibitorlösung mit der entsprechenden Menge Puffer durchgeführt.

Die Inkubation verlief unter den in Kapitel II. 2. 2. dargestellten Bedingungen (37 °C, 30 (Mikrosomen) oder 60 (Cytosol) Minuten, Reaktionsstop mit Acetonitril und Abzentrifugation). Zur Messung der Restaktivitäten und zur Berechnung der Kinetik-Daten erfolgte die HPLC mit nachfolgender Auswertung durch das Programm „Graphpad, prism2“ und die Proteinbestimmung der Proben (vgl. Kapitel II. 2. 3. 3. und II. 2. 4.).

### III. Ergebnisse

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Kinetik-Untersuchung, der RT-PCR und des ELISA befindet sich am Ende dieses Abschnitts (Tabelle III. 5.).

#### III. 1. Enzymkinetik der Carbonylreduktion von NNK

Die Bestimmung der Kinetiken für die mikrosomale und cytosolische NNK-Carbonylreduktion in den Zellfraktionen von 17 Patienten erfolgte mit Substratkonzentrationen zwischen 0,05 und 5 mM NNK. Tabelle III. 1. stellt die so ermittelten kinetischen Parameter  $V_{\max}$ ,  $K_m$  und  $Cl_{\text{int}}$  dar.

Die interindividuellen Unterschiede der Enzymaktivität werden anhand der  $Cl_{\text{int}}$  deutlich: Sie reicht in den Mikrosomenfraktionen von 0,11 bis 3,42, in den Cytosolfraktionen von 0,01 bis 0,53. Im wesentlichen sind diese Differenzen auf variierende  $V_{\max}$ -Werte, also Mengenunterschiede der Enzyme, zurückzuführen. Die mikrosomalen Werte variieren mit einer Standardabweichung von 1,07 bei einem Mittelwert von 2,2, die cytosolischen Werte mit einer Standardabweichung von 0,16 bei einem Mittelwert von 0,24.

Insbesondere die cytosolischen Meßwerte weisen in mehreren Fällen jedoch auch deutlich schwankende  $K_m$ -Werte auf: Die Standardabweichung der mikrosomalen  $K_m$ -Werte beträgt 0,87 bei einem Mittelwert von 2,25, die der cytosolischen  $K_m$ -Werte beträgt 21,79 bei einem Mittelwert von 14,47. Die möglicherweise besondere Bedeutung dieses Umstandes ist in Kapitel IV. 3. näher erläutert.

Gemessen an der mittleren  $Cl_{\text{int}}$  aller Patienten ist außerdem festzustellen, daß die Carbonylreduktion von NNK in der Mikrosomenfraktion ( $Cl_{\text{int}} = 2,2$ ) insgesamt mit einer höheren Aktivität abläuft als in der cytosolischen Fraktion ( $Cl_{\text{int}} = 0,24$ ).

Abbildung III. 1. stellt beispielhaft anhand der Daten von sechs Patienten zum einen interindividuelle Unterschiede, zum anderen intraindividuelle Unterschiede der Kinetiken für Mikrosomen und Cytosol graphisch dar.

Tab. III. 1.: Michaelis-Menten-Kinetik. Werte für Mikrosomen und Cytosol.

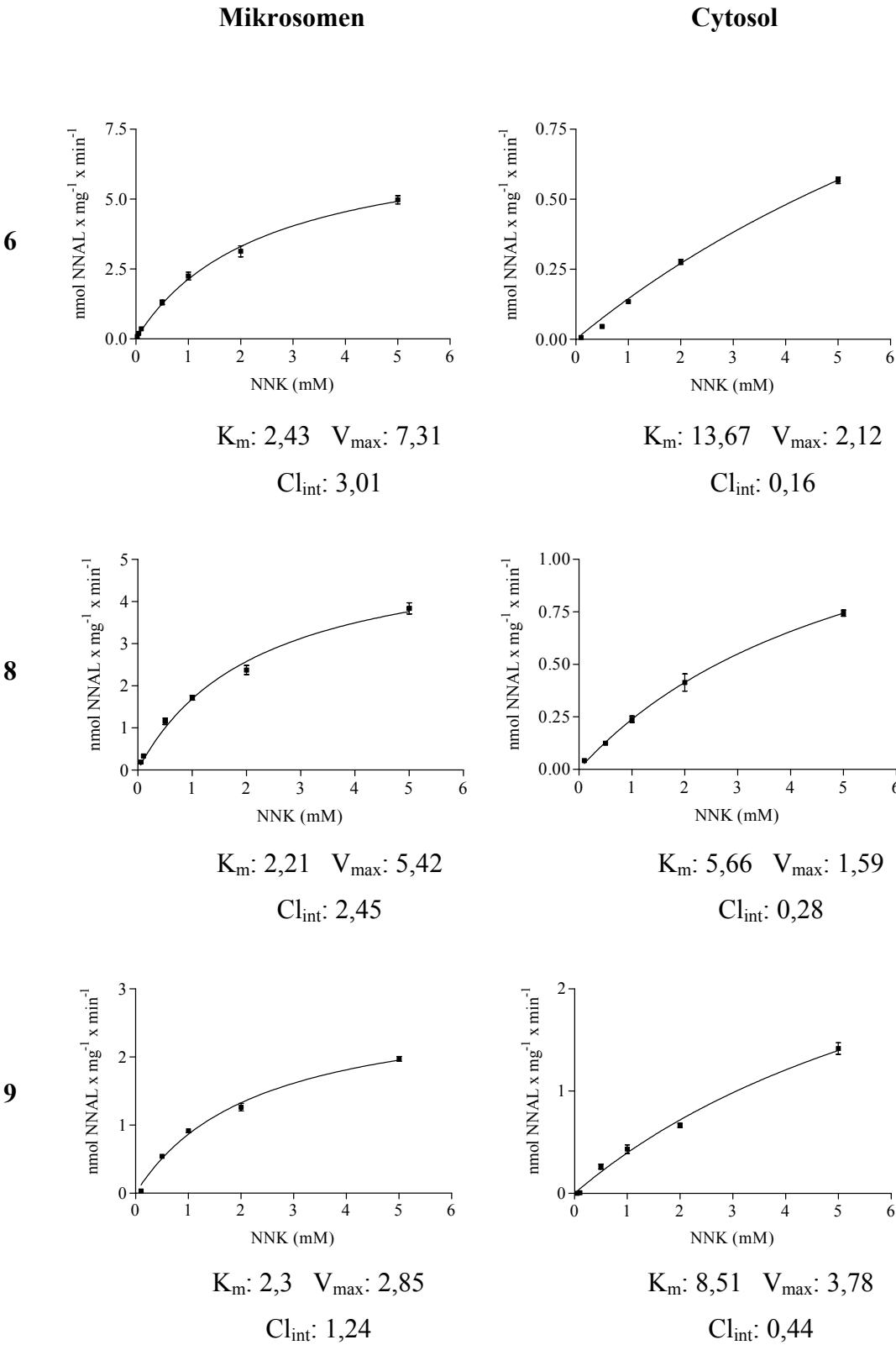
Mikrosomen				Cytosol			
Pat.	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>	Cl <sub>int</sub>	Pat.	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>	Cl <sub>int</sub>
1	8,04	3,76	2,15	1	8,26	16,52	0,5
2	5,96	1,81	3,3	2	0,72	3,75	0,19
3	3,64	1,92	1,9	3	0,6	2,12	0,28
4	3,18	3,29	0,97	4	5,14	14,92	0,34
5	8,67	2,11	4,1	5	0,96	3,58	0,27
6	7,31	2,43	3,01	6	2,12	13,67	0,16
7	5,44	2,84	1,92	7	1,62	13,48	0,12
8	5,42	2,21	2,45	8	1,59	5,66	0,28
9	2,85	2,3	1,24	9	3,78	8,51	0,44
10	4,85	1,87	2,6	10	1,51	7,23	0,21
11	7,47	2,77	2,7	11	1,62	4,53	0,36
12	1,92	1,11	1,74	12	1,06	6,09	0,17
13	8,56	2,5	3,42	13	1,37	9,55	0,14
14	5,99	2,12	2,83	14	1,97	3,72	0,53
15	1,33	1,93	0,69	15	0,39	21,46	0,02
16	-	-	-	16	0,16	15,03	0,01
17	0,36	3,22	0,11	17	0,95	96,2	0,01

Bei den Werten handelt sich um Durchschnittswerte, die aus drei bis vier getrennten Messungen derselben Patientenprobe ermittelt wurden. Wie in der Einleitung dargestellt, wird für die Mikrosomen überwiegend von einem Umsatz durch 11 $\beta$ -HSD 1 ausgegangen, für das Cytosol überwiegend von einem Umsatz durch die Carbonylreduktase. „-“ = keine meßbare Aktivität.

V<sub>max</sub> ist nach der Michaelis-Menten-Kinetik die maximale Geschwindigkeit, mit der ein Enzym sein Substrat (hier NNK) zum Produkt umsetzen kann (hier nmol NNAL pro mg Protein in einer Minute). Der Wert ist abhängig von der Menge des vorhandenen Enzyms. Je höher die Enzymmenge ist, desto höher liegt die erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit.

K<sub>m</sub> ist die Michaeliskonstante und gibt die Substratkonzentration wieder, bei der ein Enzym die Hälfte der maximalen Umsatzgeschwindigkeit bewirkt (hier mM NNK). Diese Konstante ist abhängig von der Spezifität bzw. der Affinität des Enzyms zum Substrat. Ist der Betrag niedrig, so liegt eine hohe Spezifität/Affinität vor. Wird ein Substrat von nur einem Enzym umgesetzt, ist bei interindividuellen Messungen auch ein annähernd konstanter K<sub>m</sub>-Wert zu erwarten.

Cl<sub>int</sub> („Intrinsic Clearance“ = Intrinsische Clearance) ist der Quotient aus V<sub>max</sub> und K<sub>m</sub>. Je höher die maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms und/oder je niedriger die Michaeliskonstante, desto größer die „Intrinsic Clearance“.



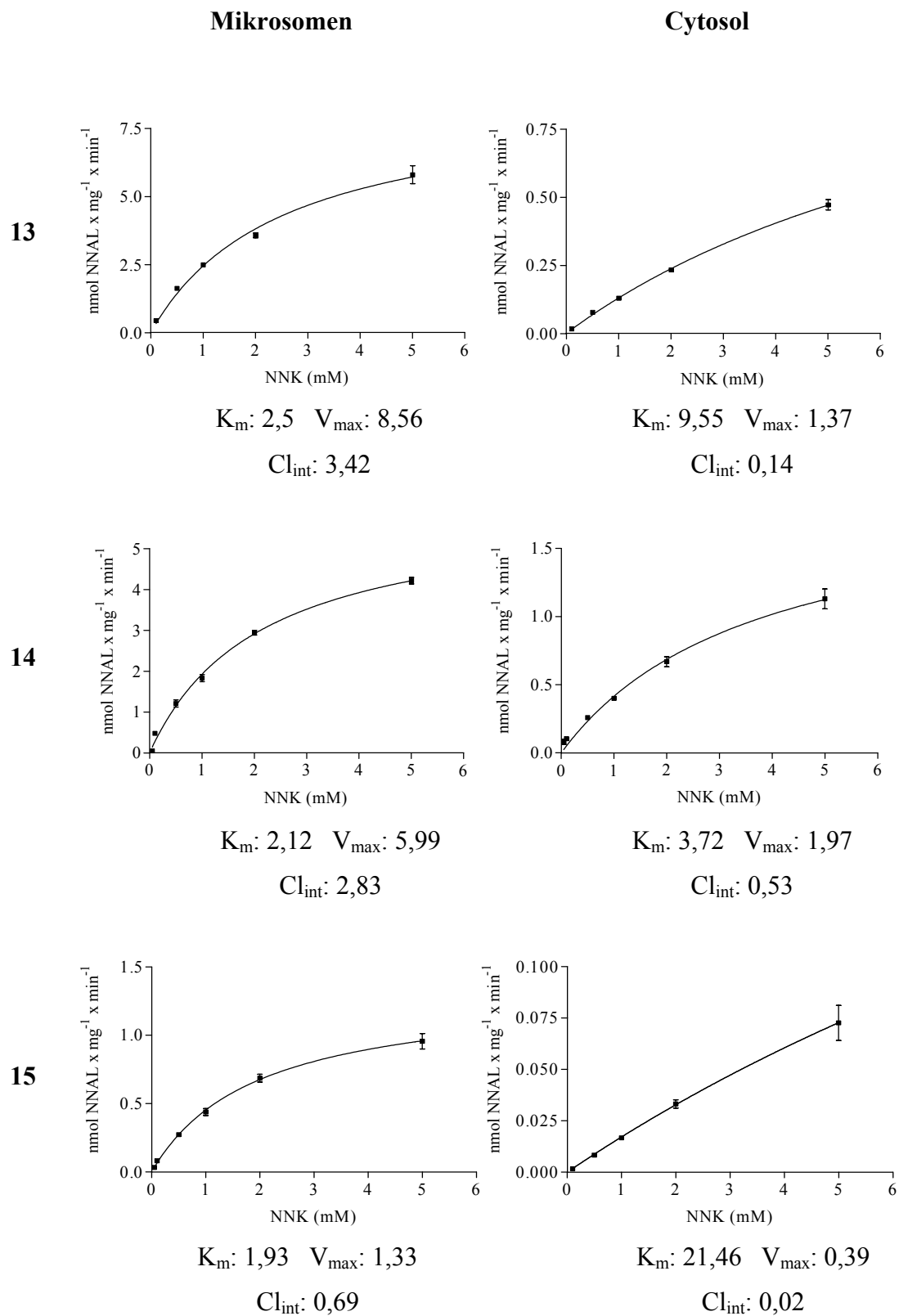


Abb. III. 1.: Für beispielhaft ausgewählte Patienten (6, 8, 9, 13, 14, 15) ist der NNK-Umsatz graphisch als Michaelis-Menten-Kinetik für Mikrosomen und Cytosol dargestellt. Die bereits genannten charakteristischen Werte sind nochmals einzeln unter jeder Grafik angegeben. Die x-Achse zeigt die eingesetzte NNK-Menge in mM, die y-Achse den Substratumsatz als NNAL-Bildung pro mg Protein in einer Minute.



### III. 2. RT-PCR der mRNA für 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase

Lungengewebeproben von 17 Patienten wurden zur RNA-Extraktion genutzt, um mittels RT-PCR Unterschiede in den individuellen genetischen Voraussetzungen für die Bildung von 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase (CR) aufzuzeigen. Abbildung III. 2. zeigt die Ergebnisse der RT-PCR anhand der fotografierten Elektrophorese-Gele. Für die weitere Auswertung wurden die optischen Dichten der enzymespezifischen Banden zu denen eines internen Standards, dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin, in Relation gesetzt; Tabelle III. 2. zeigt für jeden Patienten den Quotienten der optischen Dichte des Internem Standards und der 11 $\beta$ -HSD 1 bzw. Carbonylreduktase.

Tab. III. 2.: RT-PCR, die optischen Dichten der Elektrophoresebanden.

Pat.	11 $\beta$ -HSD 1	CR
1	0,53	0,68
2	0,25	0,8
3	0,17	1,66
4	0,65	0,57
5	0,98	0,94
6	0,38	0,96
7	1,13	0,8
8	0,4	0,45
9	keine Bande	0,22
10	0,2	0,3
11	0,15	0,43
12	0,46	0,51
13	0,44	0,62
14	0,01	1,29
15	0,47	0,48
16	0,15	0,35
17	0,38	0,43

Dargestellt sind die jeweiligen optischen Dichten als Ergebnisse der RT-PCR, abgeglichen am internen Standard, als Ausdruck der mRNA-Mengen von 11 $\beta$ -HSD 1 und CR. Es handelt sich um Durchschnittswerte aus drei getrennten Experimenten, d.h. PCR-Ansätzen, für jedes Enzym und jeden Patienten.

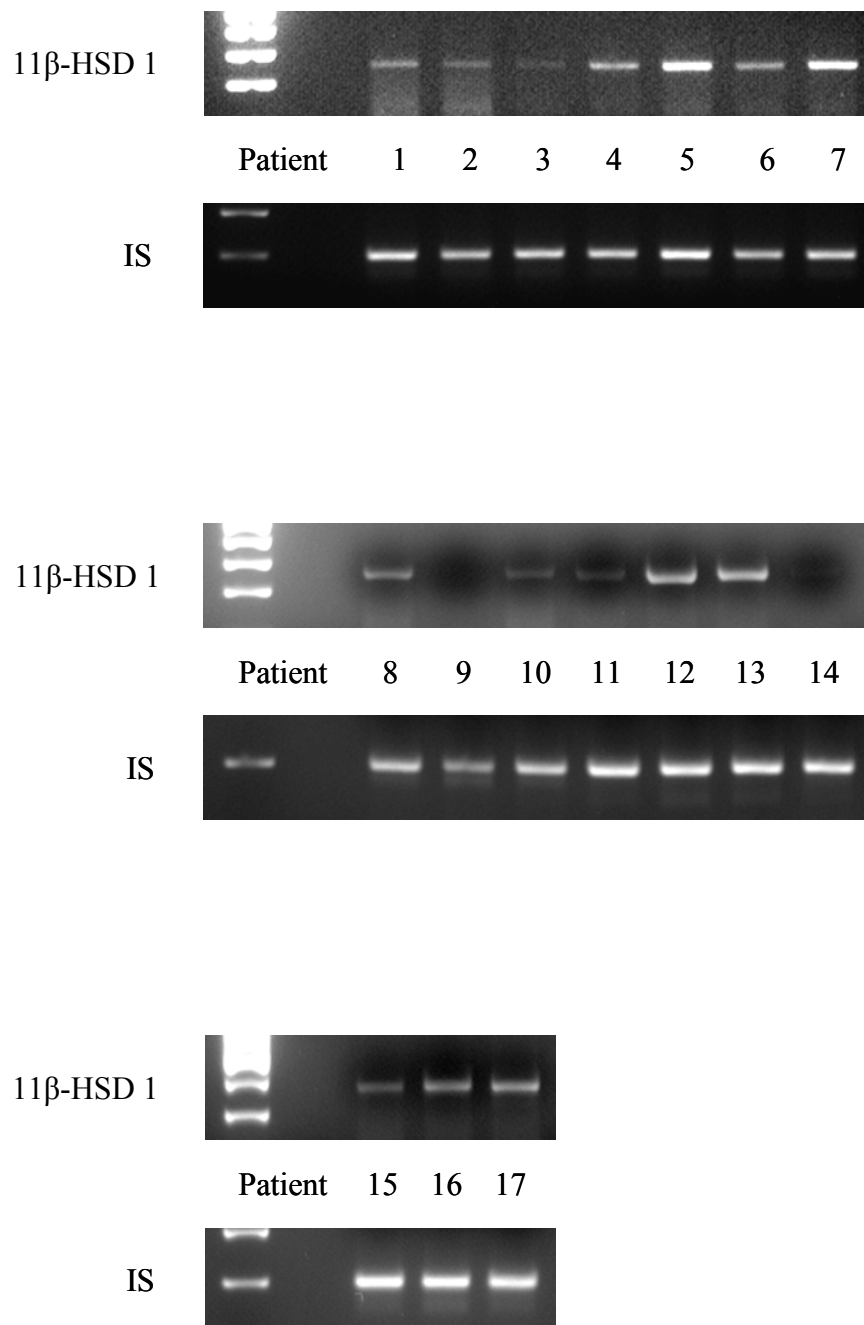


Abb. III. 2. a): RT-PCR-Banden 11β-HSD 1. Aus drei getrennten PCR-Ansätzen wird hier beispielhaft je ein Elektrophoreseergebnis vorgestellt. Die Produkte der RT-PCR aus Lungengewebe der 17 Patienten stellen sich entsprechend der mRNA-Mengen für die 11β-HSD 1 als mehr oder weniger intensive Banden in der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid dar. Die Lage der Banden für die 11β-HSD 1 entspricht der erwarteten Fragmentgröße von 395 Basenpaaren. Zusätzlich ist der Interne Standard abgebildet (s. o.). Die Bande Nr. 14 ist aus technischen Gründen hier nicht sichtbar. Im Programm „Image Master“ konnte jedoch eine minimale Intensität der optischen Dichte festgestellt werden, wie auch die per Computer gespeicherte Abbildung auf dem Bildschirm zeigt.

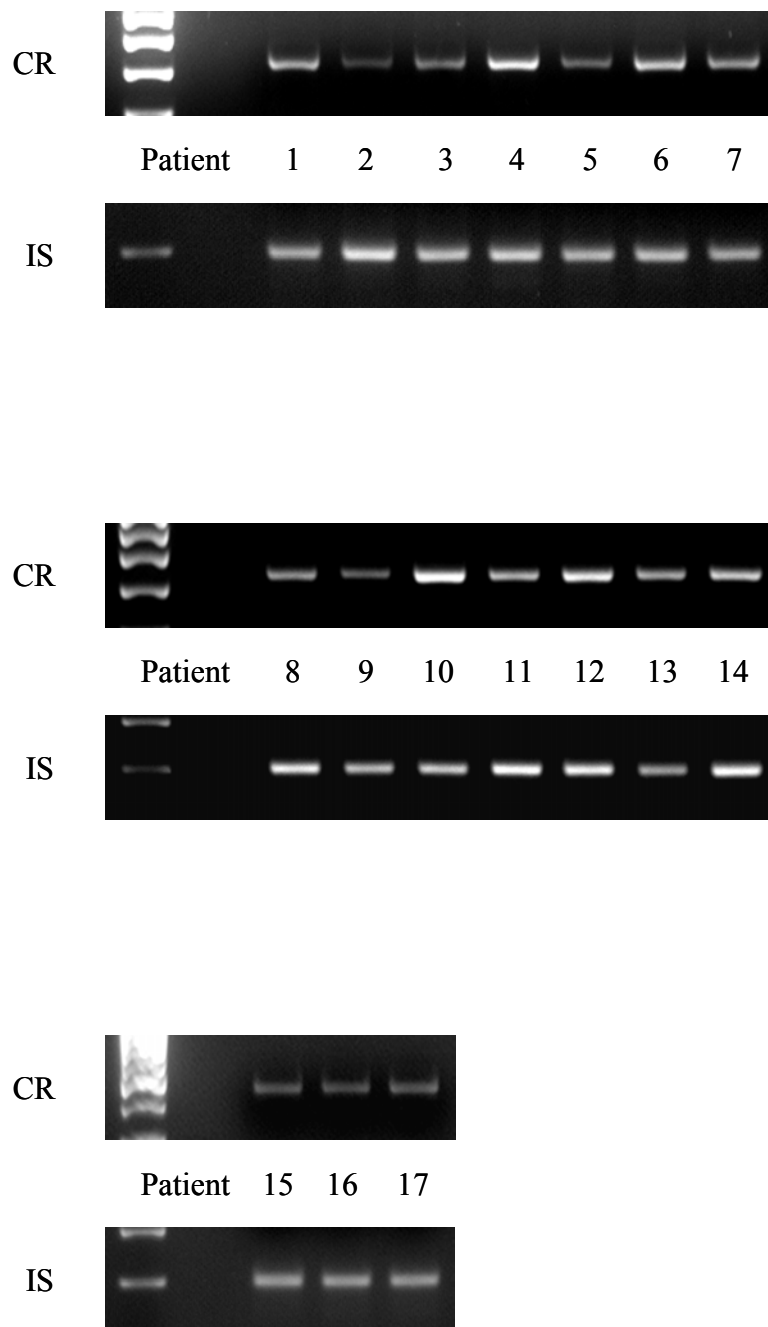


Abb. III. 2. b): RT-PCR-Banden CR. Auch hier handelt es sich um Beispielbilder aus drei RT-PCR-Versuchsansätzen. Die individuell unterschiedlichen mRNA-Mengen für die Carbonylreduktase werden durch verschieden intensiv ethidiumbromid-gefärbte Banden repräsentiert, die in ihrer Lage der erwarteten Fragmentgröße von 409 Basenpaaren entsprechen. Zusätzlich ist der Interne Standard abgebildet (s. o.).

Beim Vergleich mit den oben angegebenen optischen Dichten fallen in den Banden-Intensitäten relative Unterschiede auf, die sich aus den Durchschnittswerten dreier getrennter Experimente erklären.

III. 3. ELISA: Die Expression der 11β-HSD 1 in Lungenmikrosomen

Zur Bestimmung der tatsächlichen Expression des Enzyms 11β-HSD 1 mittels Sandwich-ELISA wurden Mikrosomenfraktionen aus Lungen der Patienten 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 verwendet. Die Mengen der übrigen Gewebeproben aus den vorangegangenen Experimenten waren zu gering, so daß sie nicht untersucht werden konnten. Neben kommerziell hergestellten Antikörpern kamen in der Arbeitsgruppe selbst hergestellte affinitätsgereinigte Antikörper gegen die menschliche 11β-HSD 1 zum Einsatz (BLUM et al., 2000). Für jeden Patienten wurden Reaktionen in drei unterschiedlichen Kavitäten ausgewertet. Abbildung III. 3. und Tabelle III. 3. zeigen die Meßergebnisse. An ihnen lassen sich ca. 7- bis ca. 120-fache Unterschiede in der individuellen Immunreaktivität feststellen.

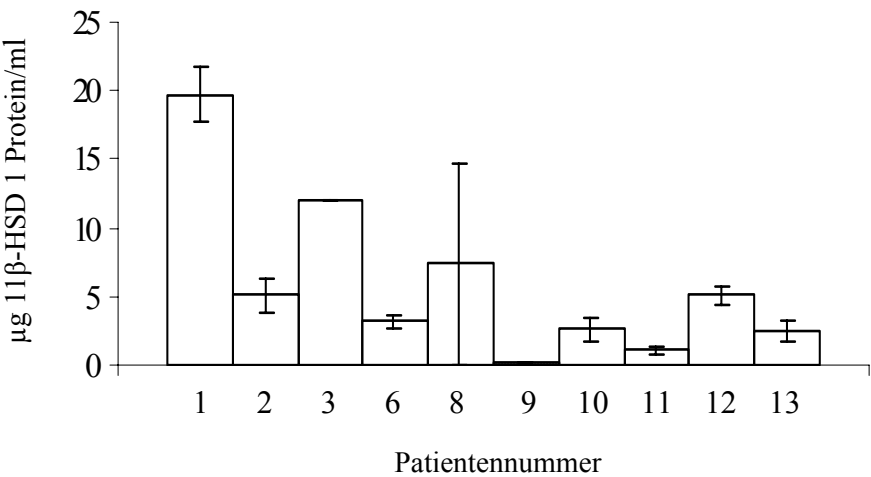


Abb. III. 3.: ELISA. Proben von 10 Patienten reichten für die Bestimmung der Expression der mikrosomalen 11β-HSD 1 in menschlichem Lungengewebe per ELISA. Die Werte sind als µg 11β-HSD 1 Protein/ml angegeben, jeweils als Mittelwert von drei Experimenten mit Darstellung der Standardabweichung.

Tab. III. 3.: ELISA. Wie Abb. III. 3., in absoluten Zahlen in µg.

Pat.	1	2	3	6	8	9	10	11	12	13
µg	19,73	5,1	12,1	3,17	7,35	0,16	2,6	1,05	5,1	2,5

### III. 4. Inhibitoruntersuchungen der carbonylreduzierenden Enzyme

Die individuelle Enzymaktivität, d.h. die Beteiligung eines Enzyms in einer biologischen Fraktion, kann auch über das Ausmaß einer Hemmung des jeweiligen Enzyms mit spezifischen Inhibitoren ermittelt werden. Hier wurde die Hemmung der NNAL-Bildung aus NNK gemessen. Dabei wurde Glycyrrhetinsäure vorwiegend als Hemmstoff der 11 $\beta$ -HSD 1 und Rutin vorwiegend als Hemmstoff der Carbonylreduktase eingesetzt. Mikrosomen und Cytosol wurden mit den Inhibitoren versetzt. Für eine Untersuchung beider Fraktionen reichten die Reste des ursprünglichen Materials jedoch nur bei den Patienten mit den Nummern 10 und 12. Von zwei weiteren Patienten, mit den Nummern 8 und 9, konnten nur die Mikrosomen in die Aktivitätsbestimmung eingehen. Die übrigen in der Grafik dargestellten Daten stammen von zusätzlichen Patientenproben, die nicht Gegenstand der sonstigen Experimente dieser Arbeit waren und mit A, B, C, D, E, F bezeichnet wurden.

Wie in Abbildung III. 4. gezeigt, minderten beide Inhibitoren die NNAL-Bildung in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Eine Hemmung auf 0% der Aktivität wurde jedoch nicht erreicht, so daß neben der 11 $\beta$ -HSD 1 und der Carbonylreduktase weitere Enzyme als Katalysatoren der NNAL-Bildung vermutet werden können.

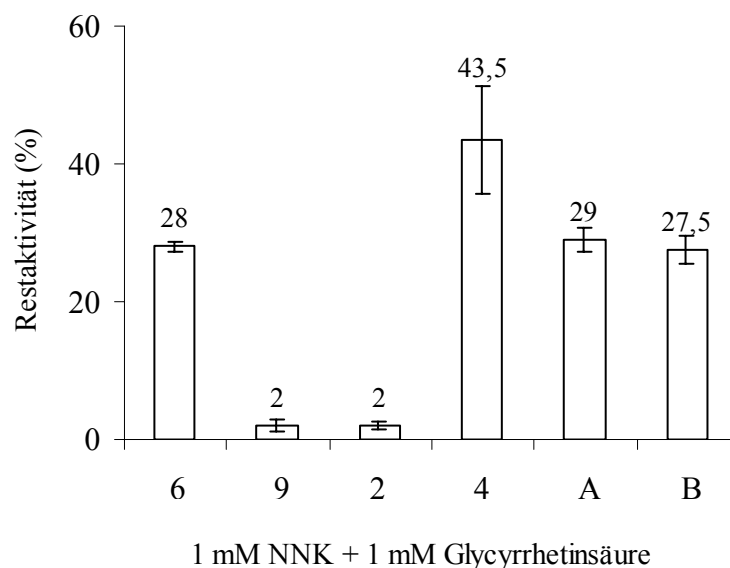


Abb. III. 4.: Erläuterung s. nächste Seite

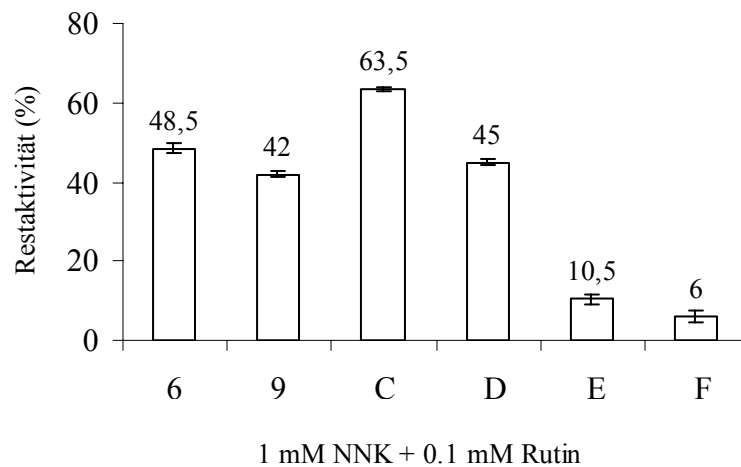


Abb. III. 4.: Inhibitorempfindlichkeit von 11 $\beta$ -HSD 1 und CR. Der Substratumsatz wurde mit 1 mM NNK-Lösung und einem NADPH-regenerierendem System durchgeführt. 1 mM Glycyrrhetinsäure und 0,1 mM Rutin wurden als Inhibitoren eingesetzt.

Die prozentualen Angaben geben die Restaktivität der inhibierten Enzyme wieder. Die Aktivitäten wurden in 3-4 Bestimmungen zu den Ergebnissen aus Kontrollexperimenten ohne Inhibitoreinsatz unter sonst identischen Versuchsbedingungen in Relation gesetzt.

Die Zahlen entsprechen den bisher verwendeten Patientennummern. Die Buchstaben stehen für Patientenproben, die in dieser Arbeit sonst nicht berücksichtigt wurden.

Tabelle III. 5.: Gesamtübersicht der Ergebnisse

Pat.	Mikrosomen					Cytosol				
	V <sub>max</sub>	Enzymaktivität K <sub>m</sub>	Cl <sub>int</sub>	RT-PCR opt. Dichte	ELISA µg / ml	Inhibitor %	V <sub>max</sub>	Enzymaktivität K <sub>m</sub>	Cl <sub>int</sub>	Inhibitor %
1	8,04	3,76	2,15	0,53	19,73	-	8,26	16,52	0,5	-
2	5,96	1,81	3,3	0,25	5,1	2	0,72	3,75	0,19	-
3	3,64	1,92	1,9	0,17	12,1	-	0,6	2,12	0,28	-
4	3,18	3,29	0,97	0,65	-	43,5	5,14	14,92	0,34	-
5	8,67	2,11	4,1	0,98	-	-	0,96	3,58	0,27	-
6	7,31	2,43	3,01	0,38	3,17	28	2,12	13,67	0,16	48,5
7	5,44	2,84	1,92	1,13	-	-	1,62	13,48	0,12	-
8	5,42	2,21	2,45	0,4	7,35	-	1,59	5,66	0,28	-
9	2,85	2,3	1,24	keine Bande	0,16	2	3,78	8,51	0,44	42
10	4,85	1,87	2,6	0,2	2,6	-	1,51	7,23	0,21	-
11	7,47	2,77	2,7	0,15	1,05	-	1,62	4,53	0,36	-
12	1,92	1,11	1,74	0,46	5,1	-	1,06	6,09	0,17	-
13	8,56	2,5	3,42	0,44	2,5	-	1,37	9,55	0,14	-
14	5,99	2,12	2,83	0,01	-	-	1,97	3,72	0,53	-
15	1,33	1,93	0,69	0,47	-	-	0,39	21,46	0,02	-
16	keine meßbare Aktivität			0,15	-	-	0,16	15,03	0,01	-
17	0,36	3,22	0,11	0,38	-	-	0,95	96,2	0,01	-

Jedem Patienten sind seine individuellen Ergebnisse aus Aktivitätsmessung, RT-PCR, ELISA und Sensitivitätsmessung mittels Inhibitor zugeordnet. Die Prozentwerte der Inhibitoruntersuchung geben die Restaktivität der Enzyme an. „-“ = keine Probe verfügbar.

## **IV. Diskussion**

### **IV. 1. Zur Entstehung von Krebserkrankungen**

Chronische Erkrankungen, Krebserkrankungen eingeschlossen, haben in den modernen Industrienationen meist multifaktorielle Ursachen. Insbesondere umweltbedingte und genetische Risikofaktoren werden mit ihren Wirkungen und Wechselwirkungen für die individuelle Empfindlichkeit des menschlichen Organismus für kanzerogene Substanzen verantwortlich gemacht.

Letzteren stehen im Menschen die individuell ausgeprägten Fähigkeiten zu Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung eines Karzinogens entgegen, die wiederum endogenen und exogenen Einflüssen unterliegen.

Zudem werden beispielsweise „susceptibility genes“ (wörtlich: Empfänglichkeitsgene) diskutiert, deren Veränderung das Erkrankungsrisiko eines Menschen bei Karzinogenexposition modifiziert. Diese Gene ermöglichen in intaktem Zustand beispielsweise die Reparatur beschädigter DNA-Anteile oder sind u.a. für Zellwachstum, Differenzierung und Genexpression verantwortlich, wie das k-ras-Protoonkogen oder das p53-Tumorsuppressorgen, wobei letzteres jedoch im Zusammenhang mit NNK eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (siehe unten, vgl. Kapitel I. 2. 3. 1.).

### **IV. 2. NNK als Karzinogen**

Bei Untersuchungen zum tabakrauchassoziierten Karzinogen NNK stehen seit längerem polymorphe Gene im Vordergrund, die für Phase I- und Phase II-Enzyme kodieren; durch diese erfährt eine Substanz zunächst eine molekulare Veränderung (Phase I), die Vorbedingung für einen finalen Stoffwechselschritt (Phase II) ist, wie die Glucuronidierung, die zur Ausscheidung führt. Die Vorgänge spielen damit eine Rolle bei der Aktivierung oder Entgiftung von Karzinogenen im Tabak. Zu den anfänglich untersuchten Enzymen gehören mehrere Cytochrom P 450-Enzyme, für die eine Beteiligung an der NNK-Aktivierung in Form der  $\alpha$ -Hydroxylierung in Leber- und Lungenmikrosomen von Tieren und Menschen nachgewiesen wurde (CRESPI et al., 1991; GUO et al., 1992; SMITH et al. (a); 1992). In menschlichen Lungenmikrosomen sind z.B. CYP 2A6 oder



CYP 2A6-verwandte Enzyme als NNK-Aktivatoren identifiziert worden (SMITH et al., 1995).

Inwiefern ein genetischer Polymorphismus in der Expression von xenobiotikametabolisierenden Cytochrom P 450-Enzymen und deren Vielfalt in den unteren Atemwegen (MACE et al., 1998) die Empfindlichkeit des Menschen für das Lungenkarzinom mitbestimmen und damit einen bedeutenden Risikofaktor darstellen, ist nicht vollständig geklärt (LONDON et al., 1997).

Wie in Kapitel I. 2. 3. 3. beschrieben, wurden inzwischen weitere Stoffwechselwege für NNK aufgeklärt, darunter solche, die zur Entgiftung beitragen. So wurden in einigen Fällen bis zu 99 % der initialen NNK-Dosis mittels Carbonylreduktion metabolisiert, wie sich in menschlichen Lungenmikrosomen am Reduktionsprodukt NNAL zeigte (SMITH et al. (a), 1992).

Die mikrosomale 11 $\beta$ -HSD 1 und die cytosolische Carbonylreduktase haben sich bisher als bedeutsamste NNK-Carbonylgruppen reduzierende Enzyme erwiesen (vgl. Kapitel I. 3.) und sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Für Raucher oder Passivraucher mit einer relativ geringen Menge an carbonylreduzierenden Enzymen oder weniger „funktionstüchtigen“ Enzymen, die die Entgiftungsschritte von NNK initiieren, ist ein erhöhtes Risiko anzunehmen, einen Lungentumor auszubilden.

Die individuelle, spezifische Reaktion und Empfindlichkeit eines menschlichen Organismus auf das Karzinogen NNK wird also von unterschiedlichen Mechanismen bedingt. Diese entscheiden im Vorfeld über die Ausprägung einer DNA-Schädigung durch NNK und folglich über die Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung mit. Die Aktivierung carbonylreduzierender Enzyme, ihre Synthese oder allgemein Entgiftungsvorgänge werden wiederum von endogenen und exogenen Mechanismen beeinflusst. Im folgenden sollen anhand der Ergebnisse mehrere Möglichkeiten der Regulation der Empfindlichkeit in Bezug auf den entgiftenden NNK-Metabolismus diskutiert werden.

### IV. 3. Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente weisen für die untersuchten Patientenproben interindividuelle Unterschiede innerhalb der einzelnen Meßparameter auf: Die mRNA-Mengen, gemessen per RT-PCR, die Aktivität, gemessen anhand der Enzymkinetik, die Restaktivitäten, gemessen bei Enzyminhibition und die Expression der jeweiligen Enzymproteine, bestimmt per ELISA, variieren jeweils deutlich von Patient zu Patient (s. Kapitel III. und Übersichtstabelle III. 4., S. 56).

Bezogen auf ein Individuum im Vergleich zu den übrigen korrelieren darüber hinaus die Werte der gemessenen Größen nicht immer, d.h. sie sind weder in gleichem Maße zusammen erhöht noch erniedrigt. So fällt beispielsweise beim Vergleich der mRNA-Mengen mit den Enzymaktivitäten die fehlende Korrelation auf.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß sich die individuellen Fähigkeiten, NNK zu verstoffwechseln, sehr wohl unterscheiden. Die Interpretation der Ergebnisse, bzw. der Rückschluß auf mögliche Ursachen gestaltet sich umso schwieriger, als bezüglich der Einflüsse auf die in den dargestellten Experimenten untersuchten Aspekte der NNK-Entgiftung mehrere Erklärungsmodelle - auch kombiniert - in Frage kommen:

- 1) **Enzymmenge:** Die Menge der am NNK-Stoffwechsel beteiligten Enzyme und/oder deren kodierende Erbinformation kann variieren.
- 2) **Proteinbiosynthese und aktives Enzym:** Sowohl auf Transkriptions- und Translationsebene für 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase, als auch im funktionellen Zustand sind komplexe Regulationsmuster möglich. Hierfür wären körpereigene, physiologische Variationen auf molekularer Ebene denkbar, sowie Fremdeinflüsse.
- 3) **Enzymvielfalt:** An der Carbonylreduktion können mehrere Enzyme, darunter bisher nicht identifizierte, wirksam beteiligt sein und in individueller Zusammensetzung funktionieren.
- 4) **Polymorphismus:** Ein genetischer Polymorphismus ist denkbar, bei dem verschiedene Allele eines Gens für Genprodukte mit unterschiedlichen Phänotypen kodieren. Diese könnten sich bei gleichem oder ähnlichem Substrat in der Umsatzqualität und -quantität interindividuell unterscheiden.

Die zweite, dritte und vierte Erklärung lassen die Möglichkeit zu, daß die zur RT-PCR eingesetzten Primer zwar spezifisch die Transkripte des 11 $\beta$ -HSD 1-Gens und des Carbonylreduktase-Gens erkennen, daß aber andererseits die mRNA von Genen oder Allelen weiterer Enzyme, die ebenfalls NNK reduzieren, nicht detektiert werden. So wären insbesondere die nicht mit den übrigen Ergebnissen korrelierenden mRNA-Werte erklärbar.

Weitere Ergebnisse unterstützen die genannten Überlegungen zur Erklärung der in der vorliegenden Arbeit entdeckten Unterschiede:

Die Untersuchung der Enzymkinetiken von 17 Patienten zeigt deutlich voneinander abweichende  $V_{\max}$ -Werte im Sinne unterschiedlich starker Mengen der Enzyme (vgl. 1)). Dabei wäre ein einheitlicher und damit enzymespezifischer  $K_m$ -Wert zu erwarten, sofern ein einziges Enzym an der Reaktion beteiligt ist. Doch auch diese Ergebnisse variieren. Die Ursache könnten zum einen stoffwechselaktive NNAL-bildende Enzyme sein (vgl. 3)), die neben der mikrosomalen 11 $\beta$ -HSD 1 und der cytosolischen Carbonylreduktase bestehen und die in unterschiedlicher Zusammensetzung mit differierenden  $K_m$ -Werten vorliegen (siehe unten), zum anderen ein genetischer Polymorphismus (vgl. 4)).

Zudem reichte das Material einiger weniger Patientenproben aus, um Untersuchungen mit spezifischen Enzyminhibitoren durchzuführen. Die unterschiedlich stark gehemmten Enzymaktivitäten lassen ebenfalls mehrere Erklärungen zu, insbesondere die Möglichkeit, daß mehrere Enzyme oder Isoformen an der Carbonylreduktion beteiligt sind (vgl. 3) und 4)), zumal die Restaktivitäten in keinem Fall auf 0% reduziert wurden. Die vier verschiedenen Parameter können nicht nur die allgemeinen interindividuellen Unterschiede, sondern auch die nicht korrelierenden Werte erklären.

#### **IV. 4. Die individuelle Empfindlichkeit für NNK und das Lungenkrebsrisiko**

Zu mehreren der genannten Aspekte, die eine persönliche Empfindlichkeit mitbedingen, gibt es bereits Untersuchungen auf mögliche Einflußfaktoren. Wesentliches Interesse galt dabei den Carbonylgruppen reduzierenden Enzymen, aber auch der Glucuronidierung im Sinne einer Phase-II-Entgiftung sowie genetischen Faktoren.

#### IV. 4. 1. Die Enzyme

Zu 2) **Proteinbiosynthese und aktives Enzym:** In vitro und teilweise in vivo wurde gezeigt, daß die 11 $\beta$ -HSD von Hormonen wie Insulin oder Schilddrüsenhormonen gehemmt, von Cortisol oder Dexamethason stimuliert wird. Exogene Substanzen wie Ethanol und Furosemid (Diuretikum) erwiesen sich als Hemmstoffe (ESCHER et al., 1995; VALENTINO et al., 1995), ebenso Naringenin, ein Flavonoid, das in hohen Konzentrationen in Grapefruitsaft zu finden ist – es hemmt NADP/H- und NAD-abhängige 11 $\beta$ -HSD, also Typ 1 und 2 (s. Einleitung) (LEE, et al.; 1996); für die in Lakritz enthaltene Glycyrrhetinsäure wurde neben der Hemmung der Enzymaktivität auch auf prätranslationaler Ebene eine inhibitorische Wirkung auf die Expression der 11 $\beta$ -HSD 1 und 2 nachgewiesen (STEWART et al., 1987; WHORWOOD et al., 1993; MASER (c), 1997; MASER & OPPERMAN, 1997; DIEDERICH et al., 1999). Eine regulierende Wirkung dieser Stoffe auch in der menschlichen Lunge liegt nahe und könnte gerade in Hinblick auf verbreitete Medikamente oder Inhaltsstoffe von Lebensmitteln und Genußstoffen eine Rolle spielen.

Es muß berücksichtigt werden, daß sich die oben genannten Daten zu einem Großteil auf keine näher bezeichnete Isoform der 11 $\beta$ -HSD beziehen. Eine Beeinflussung der 11 $\beta$ -HSD 1 durch die oben genannten Substanzen ist damit allerdings in den meisten Fällen wahrscheinlich und zum Teil auch schon nachgewiesen.

Im folgenden sind weitere Möglichkeiten der Einflußnahme auf die Enzymfunktion durch verbreitete Grunderkrankungen oder andere, durch die Lebensweise mitverursachte Faktoren dargestellt:

Erhöhte Cholesterol-Werte, beispielsweise bei Fettstoffwechselstörungen oder Ernährungsfehlern, und erhöhte Gallensäure-Mengen, unter Umständen assoziiert mit Lebererkrankungen, bewirken in vitro eine Hemmung der 11 $\beta$ -HSD 1 und 2 (PERSCHEL et al., 1991; BÜHLER et al., 1994). Sogar Streß könnte mit einer erhöhten Glukokortikoidausschüttung und der damit veränderten Auslastung der Enzyme die NNAL-Bildung mindern (MASER (c), 1997).

Auch der Tabakkonsum selbst beeinflusst die Enzymfunktion. Nikotin bewirkt im Tierversuch an der Ratte eine Hemmung der NNK-aktivierenden  $\alpha$ -Hydroxylierung und eine Steigerung der entgiftenden N-Oxidation von NNK und Glucuronidierung von NNAL (RICHTER & TRICKER, 1994). Im Vergleich von Leber und Lunge der Ratte ist

der NNK-Stoffwechsel in der Lunge allerdings weitgehend unbeeinflusst von Nikotin (SCHULZE et al., 1998). Am Menschen konnte ebenfalls ein protektiver Effekt durch Nikotin nachgewiesen werden: Bei chronischem Tabakkonsum findet sich eine vermehrte Expression der 11 $\beta$ -HSD 1 in Zellen der Rachenschleimhaut (GRONAU et al., 2002). Wie sich an Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx zeigte, scheint im Tumorgewebe selbst jedoch die Expression der 11 $\beta$ -HSD 1 vermindert zu sein, möglicherweise bedingt durch die maligne Funktionsänderung der Zellen; so wäre eine weitere Neigung der betroffenen Zellen zu Mutationen denkbar (GRONAU et al., 2002).

**Zu 3) Enzymvielfalt:** Im Verlauf der dargestellten Untersuchungen wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. Maser die Beteiligung von Mitgliedern der Aldo-Keto-Reduktase Superfamilie, AKR1C1, 1C2 und 1C4 an der NNK-Carbonylreduktion in der Leber mit unterschiedlichen Stoffwechselraten gefunden (ATALLA et al., 2000). Die bisher beachteten Enzyme 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase gehören dagegen der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen an.

Eine individuelle Kombination der Enzyme wäre mit unterschiedlichen Entgiftungsmöglichkeiten und Empfindlichkeiten für kanzerogene Substanzen verbunden, möglicherweise eben auch in menschlicher Lunge.

Letztlich bleibt nicht auszuschließen, daß auch Erkrankungen wie Asthma, COPD, pulmonaler Hochdruck aber auch nicht-atemwegsbedingte Erkrankungen wie Bluthochdruck, die zum Teil auf das Rauchen zurückzuführen sind, einen Einfluß auf das NNK-metabolisierende Enzymsystem haben.

#### **IV. 4. 2. Die Glucuronidierung**

Neben der direkten NNK-Verstoffwechselung stellt die NNAL-Glucuronidierung, die die Ausscheidung von NNAL in Urin und Galle ermöglicht (SCHULZE et al., 1992; HECHT et al. (a + b), 1993), einen bedeutenden Teil eines NNK-Entgiftungssystems dar. Dabei katalysiert eine Glucuronyl-Transferase die Konjugation von NNAL mit Glucuronsäure. Eine Reihe von Faktoren nimmt Einfluß auf dieses System und trägt damit zur Ausbildung des individuellen Risikos bei. Höheres Lebensalter, Nikotinabusus, Ernährung, bestimmte Erkrankungen, Medikamente, ethnische wie genetische Faktoren und hormonelle Einflüsse spielen dabei eine Rolle (MINERS & MACKENZIE, 1991).

#### **IV. 4. 3. Die genetische Prädisposition**

Im Gegensatz zu den genannten Systemen der NNK-Entgiftung bezieht sich die Funktion von Tumorsuppressorgenen (wie p53) und Protoonkogenen (wie k-ras) mehr auf das maligne Zellwachstum, also einen späteren Schritt in der Tumorgenese. Zumindest im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß NNK eine DNA-Methylierung des k-ras-Protoonkogens (Bildung von O-6-Methylguanin, O6MG) und damit dessen Aktivierung bewirkt; eine NNK-bedingte p53-Mutation und -Deaktivierung scheint für die Tumorgenese kaum von Bedeutung zu sein (vgl. Kapitel I. 2. 3. 2.). Untersuchungen an humanem Lungengewebe von Rauchern und Nichtrauchern stellten schließlich die Bedeutung dieser beiden Gene in Bezug auf NNK in Frage, da die beiden Gruppen keine auffälligen Unterschiede in den Häufigkeiten der Mutationen aufwiesen (GAO et al., 1997). K-ras und p53, die jedoch nachweislich bei Bronchialkarzinomen des Menschen verändert sind, dürften durch andere umwelt- und tabakassoziierte Noxen als NNK beeinflusst werden (vgl. Kapitel I. 2. 3. 1.).

Generell ist aber davon auszugehen, daß NNK mit seinen DNA-Veränderungen, Methylierung oder Phenyloxybutylierung, an der Tumorgenese beteiligt ist.

Nicht zuletzt ist eine familiäre Häufung von Bronchialkarzinomen oder auch eine Assoziation mit anderen Krebserkrankungen im Sinne eines allgemeinen familiär erhöhten Krebsrisikos wahrscheinlich (LYNCH et al., 1986; WU et al., 1996; ZHU et al., 2002; LI & HEMMINKI, 2003).

#### **IV. 5. Ausblick**

Im Anschluß an dieses Projekt wäre für ähnliche und erweiterte Experimente eine höhere Fallzahl anzustreben, ebenso wie die weitere Aufschlüsselung und Berücksichtigung der endogenen und exogenen Faktoren, die Einfluß auf die enzymatischen Funktionen haben. Von Bedeutung wären zudem die weitere Untersuchung von Enzymen, die neben der 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase die Carbonylreduktion von NNK katalysieren sowie die Identifikation funktioneller genetischer Polymorphismen und der genetischen Basis für die phänotypische Expression von Enzymen, die an der Entgiftung von Umweltkarzinogenen oder am Zellschutz gegen toxische Stoffe beteiligt sind.

In dieser Arbeit ist allein das Umgebungsgewebe eines Tumors oder das Gewebe von Patienten ohne Tumor zum Einsatz gekommen. Zum einen liegt nun nahe, auch das Tumorgewebe selbst zu untersuchen, u.a. mit der Frage, ob im erkrankten Gewebe die Enzymaktivität verändert ist, entweder im Sinne der Tumorentstehung deutlich vermindert oder infolge einer Form der Abwehrreaktion erhöht. Eine verminderte Aktivität der 11 $\beta$ -HSD 1 wurde bereits für Oropharynxkarzinome nachgewiesen (GRONAU et al., 2002; s. auch Kapitel IV. 4. 1). Fraglich ist außerdem, inwiefern ein Tumor in der Lage ist, das ihn umgebende Gewebe z.B. in seiner Enzymaktivität und -quantität zu beeinflussen. Eine Annäherung an dieses Problem wäre in vergleichenden Experimenten an Lungengewebe nachweislich lungengesunder Patienten denkbar. Dem steht jedoch die Materialgewinnung entgegen: Die Mengen frischen Gewebes, die zur Enzymaktivitätsbestimmung erforderlich sind, wären aus gesundheitlichen wie aus ethischen Gründen keinesfalls von einem Menschen ohne entsprechende Erkrankung zu erhalten; operationsbedürftige Lungenerkrankungen benignen Art sind selten (wie z.B. ein ausgeprägtes Emphysem bei schweren chronischen Lungenerkrankungen oder angeborenem  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel). Die Verwendung kleinerer aus Biopsien gewonnener Proben oder älterer mit erloschener Aktivität wäre beispielsweise lediglich für einen ELISA oder eine PCR denkbar.

Ergänzend wären die genannten zusätzlichen Untersuchungen also ein weiterer Schritt zur Aufklärung von Funktion, Vielgestaltigkeit und Umfang NNK-entgiftender Enzymsysteme, die für interindividuelle Unterschiede in den Empfindlichkeiten für NNK-induzierte Lungenkarzinome mitverantwortlich sind und das individuelle Lungenkrebsrisiko mitbedingen.

#### **IV. 6.        Fazit**

Diese Arbeit beleuchtet einen Aspekt der umfassenden, zu großen Teilen noch unbekannten Genese des tabakinduzierten Bronchialkarzinoms. Das dabei bedeutende NNK-entgiftende System in Form der carbonylreduzierenden Enzyme 11 $\beta$ -HSD 1 und Carbonylreduktase wurde bezüglich interindividueller Unterschiede untersucht. Die dabei festgestellten Variationen in der Expression und Aktivität zeigen unter Einbeziehung

verwandter Forschungsergebnisse, wie sehr die Empfindlichkeit für NNK und damit die Tumorgenese von individuellen Faktoren, endogenen wie exogenen, abhängt.

Die Arbeit läßt sich somit nicht nur als Schritt in der Aufklärung der Tumorgenese verstehen, sondern auch als Annäherung an eine Einschätzung des persönlichen Risikos, an einem tabakrauchinduzierten Bronchialkarzinom zu erkranken.

Eine weitgehende Aufdeckung von Regulationsmustern, Enzymkombinationen und nicht zuletzt von Mutationsprofilen innerhalb der Gene, die für entsprechende Enzyme oder Regulationsfaktoren kodieren, ließe eine Risikoabschätzung verbessern.

Trotzdem steht damit selbstverständlich die umfassende Schädlichkeit des Tabakkonsums außer Frage, denn auch wenn NNK zu den potentesten Karzinogenen gehört, darf die Anzahl weiterer im Tabak und Tabakrauch enthaltener krebserregender Substanzen und sonstiger gesundheitsschädlicher Stoffe nicht übersehen werden.



## V. Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom gehört in den Industrienationen zu den häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Auch als Todesursache wird es im Vergleich zu den übrigen malignen Erkrankungen in seiner Häufigkeit nur von wenigen anderen übertroffen.

Wegen uncharakteristischer klinischer Symptome ist es oft eine spät gestellte Diagnose und damit schwer therapierbar. Mithilfe einer umfassenden Kenntnis der Ätiologie ließen sich beispielsweise die Früherkennung, die Einschätzung des persönlichen Erkrankungsrisikos und damit nicht zuletzt auch die Therapie verbessern. Der Tabakkonsum ist als Hauptursache für die Entstehung des Lungenkrebses anerkannt. Die Ansätze zur Klärung der komplexen Prozesse der Ätiologie sind vielfältig, da die Schadstoffe des Tabakrauchs und sonstiger Tabakprodukte im menschlichen Organismus auf mehreren Ebenen Interaktionen bewirken: an der Oberfläche der Atemwege, im zellulären Stoffwechsel und auf genetischer Ebene in Form von Veränderungen des Erbgutes oder dieses beeinflussender Faktoren, wie Onkogene oder Tumorsuppressorgene.

Das neben anderen Karzinogenen im Tabak und Tabakrauch enthaltene Nitrosamin 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) hat sich als besonders potent erwiesen. Wird es durch Cytochrom P 450-Enzyme aktiviert, kommt es nach der Entstehung elektrophiler Metabolite zu einer Alkylierung der DNA. Damit ist das kanzerogene Potential geschaffen. Es existiert jedoch auch ein inaktivierender Metabolismus, der zunehmend Beachtung findet, seit der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 $\beta$ -HSD 1) und der cytosolischen Carbonylreduktase eine NNK reduzierende Wirkung nachgewiesen werden konnte. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), das glukuronidiert und damit leichter ausgeschieden werden kann. Sie gehören zu den wichtigsten Enzymen des entgiftenden NNK-Stoffwechsels und sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Ziel der Arbeit sollte sein, interindividuelle Unterschiede in der Aktivität und Expression der 11 $\beta$ -HSD 1 und der Carbonylreduktase im Lungengewebe verschiedener Menschen aufzuzeigen, um Hinweise auf individuelle Prädispositionen für das Bronchialkarzinom zu erhalten.

Als Untersuchungsmaterial diente das Lungengewebe von 17 Patienten, die an der Lunge operiert wurden, meist wegen maligner Erkrankungen.

Die Bestimmung der beiden NNK reduzierenden Enzyme erfolgte mittels vier verschiedener Methoden, bei denen die Enzymaktivität, die Reduktasen-spezifischen mRNA-Mengen, die absoluten 11 $\beta$ -HSD 1-Proteinmengen in den Mikrosomen und die Sensitivität der Enzyme auf spezifische Inhibitoren festgestellt wurden.

Zur Aktivitätsbestimmung beider Enzyme wurden die Zellfraktionen Mikrosomen (enthalten 11 $\beta$ -HSD 1) und Cytosol (enthält Carbonylreduktase) aller 17 Patienten mit NNK inkubiert. Über das chromatographisch gemessene Reduktionsprodukt NNAL ließen sich die individuellen Aktivitäten ermitteln.

Aus dem Gewebe jedes Patienten wurde RNA isoliert und mit der RT-PCR die Menge der 11 $\beta$ -HSD 1- und Carbonylreduktase-spezifischen mRNA individuell bestimmt.

Nach den durchgeführten Versuchen blieb von 10 Patienten genügend Material, um per ELISA den 11 $\beta$ -HSD 1-Gehalt in den Mikrosomenfraktionen zu messen.

Schließlich dienten Gewebeproben einiger der oben genannten Patienten, sowie Patientenproben, die sonst nicht Bestandteil der Arbeit waren, einer Aktivitätsmessung unter dem Einfluß spezifischer Enzyminhibitoren. Die Auswertung ergab die jeweilige Restaktivität der 11 $\beta$ -HSD 1 in den Mikrosomen und der Carbonylreduktase im Cytosol.

Die Enzyme wurden demzufolge zweifach in ihrer funktionellen, aktiven Form untersucht, einmal auf der genetischen Ebene der mRNA und als Protein per Antikörper-Identifikation – also undifferenziert in aktiver und inaktiver Form.

Die Ergebnisse der verschiedenen Enzymnachweise zeigen, daß in allen vier Meßparametern individuelle Unterschiede von Patient zu Patient vorliegen. Darüber hinaus finden sich bei den Patienten im Vergleich der jeweiligen Parameter kaum nennenswerte Korrelationen untereinander.

Damit wird deutlich, daß das Risiko, an einem tabakrauchinduzierten Bronchialkarzinom zu erkranken, interindividuell variiert und eine persönliche Empfindlichkeit für kanzerogene Substanzen wie NNK besteht. Nach den Ergebnissen ist auf mehreren Ebenen der Karzinogenese von individuell ausgeprägten endogenen wie exogenen Einflüssen auf die Interaktion zwischen Organismus und schädlicher Noxe auszugehen, die teilweise nachgewiesen sind. Nicht zuletzt sind Enzympolymorphismen denkbar, sowie das Vorkommen weiterer, hier nicht untersuchter NNK reduzierender Enzyme.

Diese Arbeit soll zur Aufdeckung der vielfältigen Faktoren beitragen, die das persönliche Erkrankungsrisiko für das Bronchialkarzinom und dessen Genese mitbedingen.

**VI. Literaturverzeichnis**

- ADAMS, J. D.; LA VOIE, E. J.; O'MARA-ADAMS, K. J.; HOFFMANN, D.; CAREY, K. D.; MARSHALL, M. V. (a): Pharmacokinetics of N-nitrosornicotine and 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in laboratory animals. *Cancer Lett.* 28 (1985), 195-201
- ADAMS, J. D.; LA VOIE, E. J.; HOFFMANN, D. (b): On the pharmacokinetics of tobacco-specific N-nitrosamines in Fisher rats. *Carcinogenesis* 6 (1985), 509-511
- AHMED, N. K.; FELSTED, R. L.; BACHUR, N. R.: Heterogeneity of anthracycline antibiotic carbonyl reductases in mammalian livers. *Biochem. Pharmacol.* 27 (1978), 2713-2719
- AHMED, N. K.; FELSTED, R. L.; BACHUR, N. R.: Comparison and characterization of mammalian xenobiotic ketone reductases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209 (1979), 12-19
- ALBISTON, A. L.; OBEYESEKERE, V. R.; SMITH, R. E.; KROZOWSKI, Z. S.: Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* 105 (1994), R11-R17
- ARRIZA, J. L.; WEINBERGER, C.; CERELLI, G.; GLASER, T. M.; HANDELIN, B. L.; HOUSMAN, D. E.; EVANS, R. M.: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA. Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237 (1987), 268-275
- ATALLA, A.; BREYER-PFAFF, U.; MASER, E.: Carbonyl reductase and three aldo-keto reductases responsible for NNK carbonyl reduction in human liver cytosol. *Nauyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Suppl.* 359 (1999), R 154
- ATALLA, A.; BREYER-PFAFF, U.; MASER, E.: Purification and characterization of oxidoreductases catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine NNK in human liver cytosol. *Xenobiotica* 30 (2000), 755-769
- AVRAMOPOULOS, D.; COX, T.; FORREST, G. L.; CHAKRAVARTI, A.; ANTONARAKIS, S. E.: Linkage mapping of the carbonyl reductase (CBR) gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. *Genomics* 13 (1992), 447-448
- AX, W.; SOLDAN, M.; KOCH, L.; MASER, E.: Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000), 293-300
- BALLARD, P. L.; CARTER, J. P.; GRAHAM, B. S.; BAXTER, J. D.: A radioreceptor assay for evaluation of the plasma glucocorticoid activity of natural and synthetic steroids in man. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 41 (1975), 290-304
- BELAI, I.; DARVAS, B.; BAUER, K.; TAG, EL-DIN, M. H.: Effects of anti-ecdysteroid azole analogues of metyrapone on the larval development of the fleshfly, *Neobellieria bullata*. *Pestic. Sci.* 44 (1995), 225-232

- BELINSKY, S. A.; DEVEREUX, T. R.; ANDERSON, M. W.: Role of DNA methylation in the activation of proto-oncogenes and the induction of pulmonary neoplasia by nitrosamines. *Mutat. Res.* 233 (1990), 105-116
- BELINSKY, S. A.; DEVEREUX, T. R.; MARONPOT, R. R.; STONER, G. D.; ANDERSON, M. W.: Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines. *Cancer Res.* 49 (1989), 5305-5311
- BELINSKY, S. A.; SWAFFORD, D. S.; FINCH, G. L.; MITCHELL, C. E.; KELLY, G.; HAHN, F. F.; ANDERSON, M. W.; NIKULA, K. J: Alterations in the K-ras and p53 genes in rat lung tumors. *Envir. Health Perspect.* 105 (1997), 901-906
- BENEDIKTSSON, R.; CALDER, A. A.; EDWARDS, C. W. A.; SECKL, J. R.: Placental 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: A key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin. Endocrinol.* 46 (1997), 161-166
- BOUCEK, R. J. Jr.; OLSON, R. D.; BRENNER, D. E.; OGUNBUNMI, E. M.; INUI, M.; FLEISCHER, S.: The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J. Biol. Chem.* 262 (1987), 15851-15856
- BLUM, A.; MARTIN, H. J.; MASER, E.: Human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 / carbonyl reductase: recombinant expression in the yeast *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Toxicology* 144 (2000), 113-120
- BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 72 (1976), 248-254
- BRITTEBO, E. B.; CASTONGUAY, A.; FURUYA, K.; HECHT, S. S.: Metabolism of tobacco-specific nitrosamines by cultured nasal mucosa. *Cancer Res.* 43 (1983), 4343-4348
- BURTON, H. R.; CHILDS, G. H.; ANDERSON, R. A.; FLEMING, P. D.: Changes in chemical composition of Burley tobacco during senescence and curing. 3. Tobacco specific nitrosamines. *J. Food Chem.* 37 (1989), 426-430
- BÜHLER, H.; PERSCHEL, F. H.; FITZNER, R.; HIERHOLZER, K.: Endogenous inhibitors of 11 beta-OHSD: existence and possible significance. *Steroids* 59 (1994), 131-135
- CARMELLA, S. G.; AKERKAR, S.; HECHT, S. S.: Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res.* 53 (1993), 721-724
- CARMELLA, S. G.; AKERKAR, S.; RICHIE, J. P.; HECHT, S. S.: Intraindividual and inter-individual differences in metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in smokers' urine. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4 (1995), 635-652
- CARMELLA, S. G.; BORUKHOVA, A.; AKERKAR, S. A.; HECHT, S. S.: Analysis of human urine for pyridine-N-oxide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific lung carcinogen. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6 (1997), 113-120

- CASTONGUAY, A.; LIN, D.; STONER, G. D.; RADOK, P.; FURUYA, K.; HECHT, S. S.; SCHUT, H. A. J.; KLAUNIG, J. E.: Comparative carcinogenicity in A/J mice and metabolism by cultured mouse peripheral lung of N'-nitrosornicotine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and their analogues. *Cancer Res.* 43 (1983), 1223-1229
- CRESPI, C. L.; PENMAN, B. W.; GELBOIN, H. V.; GONZALES, F. J.: A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P450 2D6. *Carcinogenesis* 12 (1991), 1197-1201
- CUSACK, B. J.; MUSHLIN, P. S.; VOULELIS, L. D.; LI, X.; BOUCEK, R. J. JR.; OLSON, R. D.: Daunorubicin-induced cardiac injury in the rabbit: a role for daunorubicinol? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 118 (1993), 177-185
- DE VITA, JR., VINCENT T.; HELLMAN, SAMUEL; ROSENBERG, STEVEN A.: *Cancer – Principles & Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> edition, 1997, pages 849-949
- DEMKOWICZ-DOBZANSKI, K.; CASTONGUAY, A.: Modulation by glutathione of DNA strand breaks induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its aldehyde metabolites in rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 13 (1992), 1447-1454
- DIEDERICH, S.; HANKE, B.; OELKERS, W.; BÄHR, V.: Metabolism of dexamethasone in the human kidney: nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 $\beta$ -reduction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997), 1598-1602
- DIEDERICH, S.; QUINKLER, M.; HANKE, B.; BÄHR, V.; OELKERS, W.: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen: Schlüssel-Enzyme der Mineralocorticoid- und Glucocorticoid-Wirkung. *Dtsch. med. Wschr.* 124 (1999), 51-55
- EDWARDS, C. R. W.; STEWART, P. M.; BURT, D.; BRETT, L.; MCINTYRE, M. A.; SUTANTO, W. S.; DE KLOET, E. R.; MONDER, C.: Localization of 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2 (1988), 986-989
- ESCHER, G.; MEYER, K. V.; VISHWANATH, B. S.; FREY, B. M.; FREY, F. J.: Furosemide inhibits 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in vitro and in vivo. *Endocrinology* 136 (1995), 1759-65
- FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K. J.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw Hill, 14<sup>th</sup> edition, 1998, pages 552-562
- FISCHER, S.; CASTONGUAY, A.; KAISERMANN, M.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R.: Tobacco-specific nitrosamines in Canadian cigarettes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116 (1990), 563-568
- FREY, F. J.; ESCHER, G.; FREY, B. M.: Pharmacology of 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 59 (1994), 74-79
- FOILES, P. G.; AKERKAR, S. A.; CARMELLA, S. G.; KAGAN, M.; STONER, G. D.; RESAU, J. H.; HECHT, S. S.: Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.* 4 (1991), 364-368

- FORREST, G. L.; AKMAN, S.; KRUTZIK, S.; PAXTON, R. J.; SPARKES, R. S.; DOROSHOW, J.; FELSTED, R. L.; GLOVER, C. J.; MOHANDAS, T.; BACHUR, N. R.: Induction of a human carbonyl reductase gene located on chromosome 21. *Biochim. Biophys. Acta* 1048 (1990), 149-155
- FORREST, G. L. & GONZALEZ, B.: Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.* 129 (2000), 21-40
- FUNDER, J. W.: How can aldosterone act as a mineralocorticoid? *Endocr. Res.* 15 (1989), 227-238
- FUNDER, J. W.; PEARCE, P. T.; SMITH, R.; SMITH, A. I.: Mineralocorticoid action. Target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242 (1988), 583-585
- GAO, H. G.; CHEN, J. K.; STEWART, J.; SONG, B.; RAYAPPA, C.; WHONG, W. Z.; ONG, T.: Distribution of p53 and K-ras mutations in human lung cancer tissues. *Carcinogenesis* 3 (1997), 473-478
- GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5. (J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani and D.M. Parkin) Lyon, IARC Press, 2001. (Quelle: Internet, IARC Database)
- GREENLEE, R. T.; HILL-HARMON, M. B.; MURRAY, T.; THUN, M.: Cancer statistics, 2001, *CA Cancer J. Clin.* 51 (2001), 15-36
- GRONAU, S.; KOENIG-GREGER, D.; JERG, M.; RIECHELMANN, H.: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Otolaryngol.* 27 (2002), 453-457
- GUO, Z.; SMITH, T. J.; THOMAS, P. E.; YANG, C. S.: Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by inducible and constitutive cytochrome P450 enzymes in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 298 (1992), 279-286
- HECHT, S. S.: Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines - a model for cancer prevention strategies. *Drug Metab. Rev.* 26 (1994), 373-390
- HECHT, S. S. & HOFFMANN, D.: Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogenes in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 9 (1988), 875-884
- HECHT, S. S. & HOFFMANN, D.: The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv.* 8 (1989), 273-294
- HECHT, S. S.; CARMELLA, S. G.; MURPHY, S. E.; AKERKAR, S.; BRUNNEMANN, K. D.; HOFFMANN, D. (a): A tobacco-specific lung carcinogen in the urine of men exposed to cigarette smoke. *New Engl. J. Med.* 329 (1993), 1543-1546
- HECHT, S. S.; TRUSHIN, N.; REID QUINN, C. A.; BURAK, E. S.; JONES, A. B.; SOUTHERS, J. L.; GOMBAR, C. T.; CARMELLA, S. G.; ANDERSON, L. M.; RICE, J. M. (b): Metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in patas monkey: pharmacokinetics and characterization of glucuronide metabolites. *Carcinogenesis* 14 (1993), 229-236

- HOFFMANN, D.; ADAMS, J. D.; BRUNNEMANN, K. D.; HECHT, S. S.: Assessment of tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco products. *Cancer Res.* 39 (1999), 2505-2509
- HOFFMANN, D.; HALEY, N. J.; BRUNNEMANN, K. D.: Cigarette sidestream smoke: formation analysis and model studies on the uptake by non-smokers. Presented at the US-Japan meeting on new etiology of lung cancer, Honolulu, March 1983: 21
- HOFFMANN, D. & HECHT, S. S.: Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. *Cancer Res.* 45 (1985), 935-944
- HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C. C.: p53 mutations in human cancers. *Science* 253 (1991), 49-53
- HONG, J. Y.; SMITH, T. J.; LEE, M. J.; LI, W. S.; MA, B. L.; NING, S. M.; BRADY, J. F.; THOMAS, P. E.; YANG, C. S.: Metabolism of carcinogenic nitrosamines by rat nasal mucosa and the effect of diallyl sulfide. *Cancer Res.* 51 (1991), 1509-1514
- INAZU, N.; RUEPP, B.; WIRTH, H.; WERMUTH, B.: Carbonyl reductase from human testis: purification and comparison with carbonyl reductase from human brain and rat testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1116 (1992), 50-56
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Tobacco smoking. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum. 38 (1986), 127-163
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Tobacco Habits Other than Smoking; Betel-Quid and Areca-Nut Chewing; and Some Related Nitrosamines. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum. 37 (1985), 37-136
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Tobacco smoking and tobacco smoke. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum. 83 (2002), Internet-Summary
- JAMIESON, P. M.; CHAPMAN, K. E.; EDWARDS, C. R. W.; SECKL, J. R.: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 $\beta$ -reductase in primary cultures of rat hepatocytes. Effect of physiochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 136 (1995), 4754-4761
- JORQUERA, R.; CASTONGUAY, A.; SCHULLER, H. M.: Placental transfer of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone instilled intratracheally in Syrian golden hamsters. *Cancer Res.* 52 (1992), 3273-3280
- KRESTY, L. A.; CARMELLA, S. G.; BORUKHOVA, A.; AKERKAR, S. A.; GOPALAKRISHNAN, R.; HARRIS, R. E.; STONER, G. D.; HECHT, S. S.: Metabolites of a tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), in the urine of smokeless tobacco users; relationship of urinary biomarkers and oral leukoplakia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5 (1996), 521-525
- LEE, Y. S.; LORENZO, B. J.; KOUFIS, T.; REIDENBERG, M. M.: Grapefruit juice and its flavonoids inhibit 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Pharmacol. Ther.* 59 (1996), 62-71

- LEHMAN, T. A.; BENNETT, W. P.; METCALF, R. A.; WELSH, J. A.; ECKER, J.; MODALI, R. V.; ULLRICH, S.; ROMANO, J. W.; APPELLA, E.; TESTA, J. R.: p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 51 (1991), 4090-4096
- LI, K. X. Z.; OBEYESEKERE, V. R.; KROZOWSKI, Z. S.; FERRARI, P.: Oxoreductase and dehydrogenase activities of the human and rat 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Endocrinology* 138 (1997), 2948-2952
- LI, X. & HEMMINKI, K.: Familial and second lung cancers: a nation-wide epidemiologic study from Sweden. *Lung Cancer* 39 (2003), 255-263
- LIU, L. L.; ALAOUI-JAMALI, M. A.; EL ALAMI, N.; CASTONGUAY, A.: Metabolism and DNA single strand breaks induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its analogues in primary culture of rat hepatocytes. *Cancer Res.* 50 (1990), 1810-1816
- LONDON, S. J.; DALY, A.K.; LEATHART, J. B.; NAVIDI, W. C.; CARPENTER, C. C.; IDLE, J. R.: Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Carcinogenesis* 18 (1997), 1203-1214
- LUBET, R. A.; ZHANG, Z.; WISEMAN, R. W.; YOU, M.: Use of p53 transgenic mice in the development of cancer models for multiple purposes. *Exp. Lung Res.* 26 (2000), 581-593
- LYNCH, H. T.; KIMBERLING, W. J.; MARKVICKA, S. E.; BISCONE, K. A.; LYNCH, J. F.; WHORTON, E. JR.; MAILLIARD, J.: Genetics and smoking-associated cancers. A study of 485 families. *Cancer* 57 (1986), 1640-1646
- MACE, K.; BOWMAN, E. D.; VAUTRAVERS, P.; SHIELDS, P. G.; HARRIS, C. C.; PFEIFER, A. M.: Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur. J. Cancer* 34 (1998), 914-920
- MASER, E. (a): 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase responsible for carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes. *Cancer Res.* 58 (1998), 2996-3003
- MASER, E. (b): 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: another steroid metabolizing enzyme involved in detoxification processes. *Current Topics in Steroid Research* 1 (1998), 37-57
- MASER, E. (c): Stress, hormonal changes, alcohol, food constituents and drugs: factors that advance the incidence of tobacco smoke-related cancer? *Trends Pharmacol. Sci.* 18 (1997), 270-275, Review
- MASER, E. & BANNENBERG, G. (a): The purification of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase from mouse liver microsomes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 48 (1994), 257-263
- MASER, E. & BANNENBERG, G. (b): 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994), 1805-1812



- MASER, E. & NETTER, K. J.: Purification and properties of a metyrapone-reducing enzyme from mouse liver microsomes-this ketone is reduced by an aldehyde reductase. *Biochem. Pharmacol.* 38 (1989), 3049-3054
- MASER, E. & NETTER, K. J.: Reductive metabolism of metyrapone by a quercitrin-sensitive ketone reductase in mouse liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 41 (1991), 1595-1599
- MASER, E. & OPPERMAN, U. C.: Role of type-1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *Eur. J. Biochem.* 249 (1997), 365-369, Review
- MASER, E.; RICHTER, E.; FRIEBERTSHÄUSER, J.: The identification of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase as carbonyl reductase of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Eur. J. Biochem.* 238 (1996), 484-489
- MASER, E.; STINNER, B.; ATALLA, A.: Carbonyl reduction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by cytosolic enzymes in human liver and lung. *Cancer Lett.* 148 (2000), 135-144
- MASER, E.; VOLKER, B.; FRIEBERTSHAUSER, J.: 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry* 41 (2002), 2459-2465
- MATSUURA, K.; BUNAI, Y.; OHYA, I.; HARA, A.; NAKANISHI, M.; SAWADA, H.: Ultrastructural localization of carbonyl reductase in mouse lung. *Histochem. J.* 26 (1994), 311-316
- MATZINGER, S. A.; CRIST, K. A.; STONER, G. D.; ANDERSON, M. W.; PEREIRA, M. A.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J.; LUBET, R. A.; YOU, M.: K-ras mutations in lung tumors from A/J and A/J x TSG-p53 F1 mice treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 16 (1995), 2487-2492
- MINERS, J. O. & MACKENZIE, P. I.: Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol. Ther.* 51 (1991), 347-369
- MONDER, C. & SHACKLETON, C. H. L.: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: fact or fancy? *Steroids* 44 (1984), 383-417
- MORSE, M. A.; LAGRECA, S. D.; AMIN, S. G.; CHUNG, F. L.: Effects of indole-3-carbinol on lung tumorigenesis and DNA methylation induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and on metabolism and disposition of NNK in A7J mice. *Cancer Res.* 50 (1990), 2613-2617
- MURPHY, S. E.; CARMELLA, S. G.; IDRIS, A. M.; HOFFMANN, D.: Uptake and metabolism of carcinogenic levels of tobacco-specific nitrosamines by Sudanese snuff dippers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 3 (1994), 423-428
- MURPHY, S. E.; HEIBLUM, R.; TRUSHIN, N.: Comparative metabolism of N'-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by cultured F344 rat oral tissue and esophagus. *Cancer Res.* 50 (1990), 4685-4691

- MUSTONEN, R.; SCHOKET, B.; HEMMINKI, K.: Smoking-related DNA adducts. <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of 7-methylguanine in human bronchial and lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14 (1993), 151-154
- NAKAYAMA, T.; MATSUURA, K.; NAKAGAWA, M.; HARA, A.; SAWADA, H.: Subcellular distribution and properties of carbonyl reductase in guinea pig lung. *Arch. Biochem. Biophys.* 264 (1988), 492-501
- OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S.; BRENNER, D. E.; FLEISCHER, S.; CUSACK, B. J.; CHANG, B. K.; BOUCEK, R. J. JR.: Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 3585-3589
- OPPERMANN, U. C. T.; NETTER, K. J.; MASER, E.: Cloning and primary structure of murine 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ microsomal carbonyl reductase. *Eur. J. Biochem.* 227 (1995), 202-208
- OREFFO, V. I.; LIN, H. W.; PADMANABHAN, R.; WITSCHI, H.: K-ras and p53 point mutations in 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced hamster lung tumors. *Carcinogenesis* 14 (1993), 451-455
- OZOLS, J.J.: Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 2305-2312
- PERSCHEL, F. H.; BÜHLER, H.; HIERHOLZER, K.: Bile acids and their amidates inhibit 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase obtained from rat kidney. *Pflügers Arch.* 418 (1991), 538-543
- PRESTON-MARTIN, S.: Evaluation of the evidence that tobacco-specific nitrosamines (TSNA) cause cancer in humans. *Crit. Rev. Toxicol.* 21 (1991), 295-298
- REKKA, E. A.; SOLDAN, M.; BELAI, I.; NETTER, K. J.; MASER, E.: Biotransformation and detoxification of insecticidal metyrapone analogues by carbonyl reduction in the human liver. *Xenobiotica* 26 (1997), 1221-1229
- RICHTER, E. & TRICKER, A. R.: Nicotine inhibits the metabolic activation of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats. *Carcinogenesis* 15 (1994), 1061-1064
- RIVENSON, A.; HOFFMANN, D.; PROKOPCZYK, B.; AMIN, S.; HECHT, S. S.: Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Areca-derived N-nitrosamines. *Cancer Res.* 48 (1988), 6912-6917
- ROBERTS, D. L.: Natural tobacco flavor. *Recent Adv. Tobacco Sci.* 14 (1988), 49-81
- RODENHUIS, S.; VAN DE WETERING, M. L.; MOOI, W. J.; EVERS, S. G.; VAN ZANDWIJK, N.; BOS, J. L.: Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.* 317 (1987), 929-935
- ROSSIGNOL, G.; ALAOUJ-JAMALI, M. A.; CASTONGUAY, A.; SCHULLER, H. M.: Metabolism and DNA damage induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in fetal tissues of the Syrian golden hamster. *Cancer Res.* 49 (1989), 5671-5676

- SCHULZE, J.; MALONE, A.; RICHTER, E.: Intestinal metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in rats: sex-differences, inducibility and inhibition by phenethylisothiocyanate. *Carcinogenesis* 16 (1995), 1733-1740
- SCHULZE, J.; RICHTER, E.; BINDER, U.; ZWICKENPFLUG, W.: Biliary excretion of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the rat. *Carcinogenesis* 13 (1992), 1961-1965
- SCHULZE, J.; SCHRADER, E.; FOTH, H.; KAHL, G. F.; RICHTER, E.: Effect of nicotine or cotinine on metabolism of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in isolated rat lung and liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998 Mar;357(3):344-50
- SECKL, J. R. & CHAPMAN, K. E.: The 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action - Medical and physiological aspects of the 11 $\beta$ -hydroxy-steroid dehydrogenase system. *Europ. J. Biochem.* 249 (1997), 361-364
- SMITH, T. J.; GUO, Z.; GONZALEZ, F. J.; GUENGERICH, F. P.; STONER, G. D.; YANG, C. S. (a): Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human lung and liver microsomes and cytochromes P-450 expressed in hepatoma cells. *Cancer Res.* 52 (1992), 1757-1763
- SMITH, T. J.; GUO, Z.; HONG, J. Y.; NING, S. M.; THOMAS, P. E.; YANG, C. S. (b): Kinetics and enzyme involvement in the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in microsomes of rat lung and nasal mucosa. *Carcinogenesis* 13 (1992), 1409-1414
- SMITH, T. J.; GUO, Z.; LI, C.; NING, S. M.; THOMAS, P. E.; YANG, C. S.: Mechanism of inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation in mouse by dietary phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res.* 53 (1993), 3276-3282
- SMITH, T. J.; GUO, Z.; THOMAS, P. E.; CHUNG, F. L.; MORSE, M. A.; ELKIND, K.; YANG, C. S.: Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mouse lung microsomes and its inhibition by isothiocyanates. *Cancer Res.* 50 (1990), 6817-6822
- SMITH, T. J.; STONER, G. D.; YANG, C. S.: Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung microsomes by cytochromes P450, lipoxygenase, and hydroperoxides. *Cancer Res.* 55 (1995), 5566-5573
- SOLDAN, M.; NETTER, K. J.; MASER, E.: Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996), 117-123
- STEWART, P. M.; KROZOWSKI, Z. S.; GUPTA, A.; MILFORD, D. V.; HOWIE, A. J.; SHEPPARD, M. C.; WHORWOOD, C. B.: Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to the mutation of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. *Lancet* 347 (1996), 88-91

- STEWART, P. M.; MURRY, B. A.; MASON, J. I.: Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type 1 isoform. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 79 (1994), 480-484
- STEWART P. M.; WALLACE A. M.; VALENTINO R.; BURT D.; SHACKLETON C. H.; EDWARDS C. R.: Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet* 2 (1987), 821-824
- TANNIN, G. M.; AGARWAL, A. K.; MONDER, C.; NEW, M. I.; WHITE, P. C.: The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, structure, tissue distribution, and chromosomal localisation. *J. Biol. Chem.* 226 (1991), 16653-16658
- TRICKER, A. R.; DITRICH, C.; PREUSSMANN, R.: N-nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke. *Carcinogenesis* 12 (1991), 257-261
- US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Centers for Disease Control, Office on Smoke and Health (1989), via Internet
- VALENTINO R.; TOMMASELLI A. P.; SAVASTANO S.; STEWART P. M.; GHIGGI M. R.; GALLETTI F.; MARINIELLO P.; LOMBARDI G.; EDWARDS C. R.: Alcohol inhibits 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat kidney and liver. *Horm Res.* 43 (1995), 176-80.
- VOICE, M. W.; SECKL, J. R.; EDWARDS, C. R. W.; CHAPMAN, K. E.: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in 2S FAZA hepatoma cells is hormonally regulated. *Biochem. J.* 317 (1996), 621-625
- WERMUTH, B.: Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J. Biol. Chem.* 256 (1981), 1206-1213
- WERMUTH, B.: NADP-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is homologous to NAD-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and other short-chain alcohol dehydrogenases. *Prostaglandins* 44 (1992), 5-9
- WERMUTH, B.; BOHREN, K. M.; HEINEMANN, G.; VON WARTBURG, J. P.; GABBAY, K. H.: Human carbonyl reductase, nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 16185-16188
- WERMUTH, B.; PLATTS, K. L.; SEIDEL, A.; OESCH, F.: Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986), 1277-1282
- WIRTH, H. & WERMUTH, B.: Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 40 (1992), 1857-1863
- WHORWOOD, C. B.; FRANKLYN, J. A.; SHEPPARD, M. C.; STEWART, P. M.: Tissue localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41 (1992), 21-28
- WHORWOOD, C. B.; MASON, J. I.; RICKETTS, M. L.; HOWIE, A. J.; STEWART, P. M.: Detection of human 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms using reverse-

- transcriptase-polymerase chain reaction and localization of the type 2 isoform to renal collecting ducts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110 (1995), R7-R12
- WHORWOOD C. B.; SHEPPARD M. C.; STEWART P. M.: Licorice inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels and potentiates glucocorticoid hormone action. *Endocrinology* 132 (1993), 2287-2292
- WU, A. H.; FONTHAM, E. T.; REYNOLDS, P.; GREENBERG, R. S.; BUFFLER, P.; LIFF, J.; BOYD, P.; CORREA, P.: Family history of cancer and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 143 (1996), 535-542
- ZHU, Y.; SPITZ, M. R.; STROM, S.; TOMLINSON, G. E.; AMOS, C. I.; MINNA, J. D.; WU, X.: A case-control analysis of lymphocytic chromosome 9 aberrations in lung cancer. *Int. J. Cancer.* 102 (2002), 536-540

**VII.       Anhang**

Lehrer	I
Danksagung	II
Publikationen	III

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Greifswald: Fanghänel, Freiberg, Hannich, Hartmann, Hetzheim, Hübner, Kramer, Machill, Miehe, Paul, Honig, Rettig, Rune, Schmiedebach, Seipelt, Wilke.

In Kiel: de Decker, Dörner, Herdegen, Kimming, Klöppel, Krüger, Meyer, Oster, Rautenberg, Schubert, Reker, Santer, Sauter, Sprenger, Ullmann, Unger, Wawersik.

In Marburg: Arnold, Barth, Bartsch, Baum, Bertalanffy, Beyer, Bock, Christiansen, Donner-Banzhoff, Engel, Geldner, Griss, Gotzen, Happle, Heller, Heidenreich, Hellinger, Hesse, Hofmann, Klose, König, Krieg, Kroh, Kroll, Lennartz, Lippert, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Oertel, Pfeiffer, Remschmidt, Rothmund, Schnabel, Schreiber, Schulz, Seyberth, Sommer, Vohland, Wagner, Werner, Wulf.

### **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Edmund Maser für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in das Institut für Pharmakologie und Toxikologie sowie in seine Arbeitsgruppe herzlich bedanken. Ich danke ihm zudem für die Betreuung meiner Arbeit, für eine Reihe organisatorischer Tips und insbesondere für das Vorantreiben meiner Veröffentlichung.

Die Arbeitsgruppe Maser hat wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Technische Assistenz erhielt ich von Marga Losekam und Jutta Friebertshäuser mit erfahrungsreichem Wissen und besonderem „Know How“ sowie von Anja Reitz. Wissenschaftlich und technisch standen mir vor allem Dr. Awad Atalla und Dr. Hans-Jörg Martin immer hilfsbereit zur Seite, letzterer auch bei nicht immer leichten Computerfragen. Ihnen allen sei besonders gedankt.

Für hilfreiche Anregungen danke ich Anja Möller, Dr. Gerd Nagel, Dr. Andreas Blum, und Dr. Guangming Xiong .

Aus anderen Arbeitsgruppen möchte ich Beate Kleb und Dr. Achim Aigner für gute Ratschläge und praktische Tips danken.

Desweiteren danke ich Annkathrin Kube und Tim Niemeyer für ihre schonungslose und gute Kritik beim Korrekturlesen.

Einen herzlichen Dank an die gesamte Brüder-Grimm-WG, meinem zweiten zu Hause. Hier wurden meine Laune und meine Energien aufgefrischt und computertechnische Belange von Eckhard Steinmüller, Thomas Eckert und Sven Siggelkow betreut.

Karin Emmrich sei ganz herzlich gedankt für ihren ausdauernden Beistand und die vielseitige Hilfe in der Endphase der Arbeit.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Mutter, die mich jederzeit in vielerlei Hinsicht unterstützt und ermutigt hat.



## Publikationen

Wesentliche Teile der Arbeit wurden publiziert als:

### Originalarbeit

Finckh, C.; Atalla, A.; Nagel, G.; Stinner, B.; Maser, E.:  
Expression and NNK reducing activities of carbonyl reductase and 11 $\beta$ -hydroxysteroid  
dehydrogenase type 1 in human lung.  
Chem. Biol. Interact. 130-132 (2001), 761-773

### Vortrag

Nagel, G.; Finckh, C.; Maser, E.:  
Polymorphisms of NNK reducing enzymes in tobacco-smoke-related lung cancer?  
EU-Biotech 4<sup>th</sup> Sectional Meeting, Barcelona 2000

### Poster/Abstract

Nagel, G.; Finckh, C.; Atalla, A.; Maser, E.:  
Polymorphisms in NNK carbonyl reducing enzymes in tobacco-smoke related cancer of  
human lung?  
Tenth Conference on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism,  
Taos 2000